

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Diplomová práce**

Vliv stresu na NADP-dependentní enzymy ve vyšších rostlinách

(The influence of stress on NADP-dependent enzymes in higher  
plants)

**Školitel: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.**

**Praha 2012**

**Bc. Terézia Kovaľová**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Doubnerové, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za rady, ochotu, trpělivost a veškerou pomoc poskytnutou při průběhu vypracovávání této práce. Stejně tak děkuji Doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za veškeré poskytnuté rady.

Také bych ráda poděkovala RNDr. Václavu Černému, PhD. z katedry Analytické chemie PřF UK v Praze za odborné rady a asistenci při analytických stanoveních a Doc. RNDr. Noemi Čerovské, CSc. a Renatě Hadámkové z Ústavu experimentální botaniky AV ČR za poskytnutí rostlinného a infekčního materiálu.

Můj dík patří především mé rodině za veškerou poskytnutou podporu a pomoc v průběhu mých studijních let.

## Abstract

Biotic stress in the form of viral infection, as well as abiotic salt stress, cause leaves injuries, stomata closure and decreased rate of photosynthesis. These factors lead to the limitation of plant growth and to reduced amount of coenzyme NADPH. However NADPH is an important coenzyme for many metabolic pathways such as synthesis of fatty acids, amino acids and secondary metabolites involved in stress responses. NADPH is also a coenzyme for key enzymes of antioxidant system and for many regulatory enzymes. NADP-dependent enzymes are alternative source of NADPH in plants under stress conditions.

In this work, activities of four NADP-dependent enzymes: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-malic enzyme (decarboxylating) (NADP-ME, EC 1.1.1.40) and Shikimate dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.25) were studied. Activities of all these enzymes but SDH increased in leaves of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) infected by PVY<sup>NTN</sup>. The most sensitive enzymes to viral infection were NADP-ICDH and NADP-ME, whose activity was increased in comparison with control plants 3-fold and 2,4-fold, respectively. Changes in activity of studied enzymes were also determined in plants exposed to viral infection in combination with heat-shock (40°C 2 hours). Plants, which were firstly exposed to heat-shock and then infected, showed further increase in activity of all studied enzymes. Increase in activity of NADP-ME (2,1-fold), NADP-ICDH (6-fold), G6PDH (8,7-fold) and SDH (5,5-fold) was detected in tobacco plants exposed to salt stress (100 mM NaCl). Significantly enhanced activity of non-phosphorylating Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.9, NP-GPD) (10-fold) was detected in plants exposed to salt stress. (In Czech)

## Abstrakt

Biotický stres způsobený virovou infekcí, stejně jako solný stres, se projevují omezením růstu rostlin, poškozením jejich listů, uzavřením průduchů, a tím sníženou rychlostí fotosyntézy. Ve stresovaných rostlinách tak klesá dostupnost redukovaného koenzymu NADPH, který je však významným koenzymem pro mnoho metabolických pochodů. Jedná se především o biosyntézu mastných kyselin, aminokyselin a sekundárních metabolitů rovněž se podílejících na obranných odpovědích vůči stresu. Je také koenzymem klíčových enzymů antioxidačního systému a regulačních enzymů. Alternativním zdrojem NADPH při nedostatečné fotosyntéze jsou NADP-dependentní enzymy.

Cílem této práce bylo současně sledovat změny aktivit tří hlavních NADP-dependentních enzymů: glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PDH, EC 1.1.1.49), NADP-isocitrátdehydrogenasy (dekarboxylační) (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40) a enzymu, který je naopak součástí významné biosyntetické dráhy spotřebovávající NADPH, šikimátdehydrogenasy (SDH, EC 1.1.1.25).

Aktivita všech sledovaných enzymů kromě SDH byla v listech tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) infikovaných *Y virem bramboru*, kmenem NTN v maximu infekce významně zvýšena, nejvíce NADP-ICDH (o 200 %) a NADP-ME (o 140 %). Zároveň byl sledován vliv teplotního šoku na rozvoj infekce PVY<sup>NTN</sup> a následnou odpověď v podobě změny aktivity studovaných enzymů. V rostlinách nejprve vystavených teplotnímu šoku a poté infikovaných PVY<sup>NTN</sup> došlo v maximu infekce k dalšímu zvýšení aktivity sledovaných enzymů oproti pouze infikovaným rostlinám. Také solný stres (100 mM NaCl) v listech tabáku indukoval obranné odpovědi v podobě zvýšené aktivity NADP-ME (o 110 %), NADP-ICDH (o 500 %), G6PDH (o 770 %) a SDH (o 450%). V rostlinách vystavených solnému stresu byla také významně zvýšena aktivita nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (EC 1.2.1.9, NP-GPD), a to o 900 %.

## **Klíčová slova**

Biotický stres

Solný stres

Teplotní stres

NADP-isocitrátdehydrogenasa

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

NADP-malátdehydrogenasa (dekarboxylační)

Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

Šikimátdehydrogenasa

## **Key words**

Biotic stress

Salt stress

Heat-shock

NADP-malic enzyme (decarboxylating)

NADP-isocitrate dehydrogenase

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Non-phosphorylating glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase

Shikimate dehydrogenase

## Seznam použitých zkratek

1,3-BPG	1,3-bisfosfoglycerát
3-PG	3-fosfoglycerát
AAS	atomová absorpční spektroskopie
ADP	adenosindifosfát
ASC	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	Bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
C <sub>3</sub> rostliny	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je tříuhlíkatá látka (3-fosfoglycerát)
C <sub>4</sub> rostlin	rostliny, jejichž prvním fotosyntetickým produktem je čtyřuhlíkatá látka (oxalacetát)
CAM	metabolismus rostlin z čeledi tlusticovitých (z angl. Crassulacean acid metabolism)
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DHD	3-dehydrochinátdehydratasa (EC 4.2.1.10)
DHD/SDH	komplex 3-dehydrochinátdehydratasa/šikimátdehydrogenasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
ELISA	z angl. Enzyme linked immuno sorbent assay
F-1,6-BP	D-fruktosa-1,6-bisfosfát
F-6-P	D-fruktosa-6-fosfát
g	tíhové zrychlení ( $g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$ )
G-6-P	D-glukosa-6-fosfát
G6PDH	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1. 49)
GA-3-P	D-glyceraldehyd-3-fosfát
GOGAT	glutamátsynthasa (EC 1.4.1.7 nebo EC 1.4.1.14)
GPD	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GS	glutaminsynthetasa (EC 6.3.1.2)
GS/GOGAT cyklus	glutaminsynthetasový/glutamátsynthasový cyklus
GSH	glutathion

GSSG	oxidovaný glutathion
GTP	guanosintrifosfát
HSP	Heat-shock proteiny
HSY	rostliny infikované po vystavení teplotnímu šoku
K	kontrolní rostliny
KHS	kontrolní rostliny vystavené teplotnímu šoku
NA	nikotinová kyselina
NAAD	nikotinadenindinukleotid
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NADK	NAD-kinasa
NADP <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NADP-ICDH	NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (EC 1.1.1.42,)
NADP-ME	NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40,)
NADS	NAD-synthetasa
Nam	nikotinamid
NAMN	kyselá forma nikotinmononukleotidu
N(A)MNAT	NA/Nam mononukleotidadenylyltransferasa
NamPRT	nikotinamidfosforibosyltransferasa
NAPRT	nikotinfosforibosyltransferasa
NBT	Nitroblue tetrazolium chlorid
NMN	nikotinmononukleotid
NP-GPD	nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (EC 1.2.1.9)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
QA	chinolinová kyselina
QAPRT	chinolinátfosforibosyltransferasa
PEPC	fosfoenolpyruvátcarboxylasa
PVA	<i>A virus bramboru</i>
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVY	<i>Y virus bramboru</i>
RNA	ribonukleová kyselina



ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SDH	šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25)
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
Y	infikované rostliny bez teplotního šoku
YHS	rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	NADP A REDOXNÍ STAV BUŇKY .....	1
1.2	NADP-DEPENDENTNÍ ENZYMY POSKYTUJÍCÍ NADPH .....	5
1.2.1	<i>Glukosa-6-fosfatdehydrogenasa.....</i>	5
1.2.2	<i>NADP-isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) .....</i>	8
1.2.3	<i>NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetat-dekarboxylační) .....</i>	12
1.2.4	<i>Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenasa.....</i>	16
1.3	NADP-DEPENDENTNÍ ENZYMY SPOTŘEBOVÁVAJÍCÍ NADPH.....	18
1.3.1	<i>Šikimátdehydrogenasa.....</i>	18
1.4	STRES ROSTLIN .....	21
1.4.1	<i>Biotický stres .....</i>	21
1.4.2	<i>Solný stres .....</i>	23
1.4.3	<i>Teplotní stres.....</i>	24
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METODY .....</b>	<b>28</b>
3.1	MATERIÁL .....	28
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	28
3.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	29
3.4	PĚSTOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH ROSTLIN A PROVEDENÍ JEDNOTLIVÝCH POKUSŮ	29
3.4.1	<i>Experimentální rostliny pro studium vlivu PVY<sup>NTN</sup> .....</i>	29
3.4.2	<i>Experimentální rostliny pro studium společného vlivu teplotního šoku a virové infekce .....</i>	30
3.4.3	<i>Experimentální rostliny pro studium vlivu NaCl.....</i>	30
3.5	STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY .....	30
3.5.1	<i>Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity.....</i>	31
3.5.2	<i>Stanovení enzymové aktivity NADP-ME .....</i>	31
3.5.3	<i>Stanovení enzymové aktivity NADP-ICDH .....</i>	32
3.5.4	<i>Stanovení enzymové aktivity G6PDH.....</i>	32
3.5.5	<i>Stanovení enzymové aktivity SDH .....</i>	32
3.5.6	<i>Stanovení enzymové aktivity NP-GPD .....</i>	32
3.6	ELEKTROFORETICKÉ METODY .....	32
3.6.1	<i>Elektroforetická separace v denaturujícím prostředí SDS.....</i>	32

3.6.1.1	Příprava vzorku pro SDS elektroforézu.....	32
3.6.1.2	Provedení SDS elektroforézy .....	33
3.6.1.3	Detekce bílkovin po SDS elektroforéze.....	33
3.6.2	<i>Elektroforetická separace v nativním prostředí</i> .....	33
3.6.2.1	Příprava vzorku pro nativní elektroforézu .....	33
3.6.2.2	Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze .....	34
3.6.2.3	Detekce NADP-ICDH po nativní elektroforéze .....	34
3.6.2.4	Detekce G6PDH po nativní elektroforéze .....	34
3.6.2.5	Detekce SDH po nativní elektroforéze .....	34
3.7	IMUNOCHEMICKÉ METODY.....	35
3.7.1	<i>ELISA</i> .....	35
3.7.2	<i>Imunochemická detekce proteinu HSP 70 na nitrocelulosoové membráně</i> .....	36
3.7.2.1	Přenos proteinů na nitrocelulosoovou membránu.....	36
3.7.2.2	Detekce přítomnosti HSP 70 specifickou protilátkou na nitrocelulosoové membráně.....	36
3.8	STANOVENÍ KONCENTRACE SODNÝCH IONTŮ .....	37
3.8.1	<i>Příprava vzorku pro stanovení sodných iontů</i> .....	37
3.8.2	<i>Vlastní stanovení sodných iontů</i> .....	37
3.9	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ NADP <sup>+</sup> V ROSTLINNÝCH EXTRAKTECH .....	37
3.9.1	<i>Příprava vzorku pro stanovení množství NADP<sup>+</sup></i> .....	37
3.9.2	<i>Postup stanovení množství NADP<sup>+</sup></i> .....	38
3.9.3	<i>Stanovení množství proteinů</i> .....	38
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>39</b>
4.1	STANOVENÍ pH OPTIMA STUDOVANÝCH ENZYMŮ .....	39
4.1.1	<i>Stanovení pH optima NADP-ME</i> .....	39
4.1.2	<i>Stanovení pH optima NADP-ICDH</i> .....	39
4.1.3	<i>Stanovení pH optima G6PDH</i> .....	40
4.1.4	<i>Stanovení pH optima SDH</i> .....	41
4.2	VLIV BIOTICKÉHO STRESU NA AKTIVITU NADP-DEPENDENTNÍCH ENZYMŮ.....	41
4.2.1	<i>Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v prvním pokusu</i> .....	42
4.2.2	<i>Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v druhém pokusu</i> .....	46
4.2.3	<i>Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v třetím pokusu</i> .....	49
4.2.4	<i>Kombinace infekce PVY<sup>NTN</sup> a teplotního šoku</i> .....	50
4.3	VLIV SOLNÉHO STRESU NA AKTIVITU NADP-DEPENDENTNÍCH ENZYMŮ .....	55
4.3.1	<i>Vliv solního stresu na aktivitu vybraných enzymů v prvním pokusu</i> .....	55
4.3.2	<i>Vliv solního stresu na aktivitu vybraných enzymů ve druhém pokusu</i> .....	58
4.3.3	<i>Vliv solního stresu na aktivitu vybraných enzymů ve třetím pokusu</i> .....	59

<b>5</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>70</b>

# 1 Úvod

## 1.1 *NADP a redoxní stav buňky*

Purinový dinukleotid  $\text{NADP}^+$  (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a jeho redukovaná forma NADPH mají nezastupitelnou úlohu v metabolických procesech, a to jak v biosyntéze metabolitů, tak v detoxifikačních procesech, udržování redoxní rovnováhy v buňce a v obranných reakcích vůči stresu [1,2]. V posledním období se také přenáší pozornost na regulační a signalizační funkci  $\text{NADP}^+$  v oxidačním obranném systému a syntetických drahách [2].

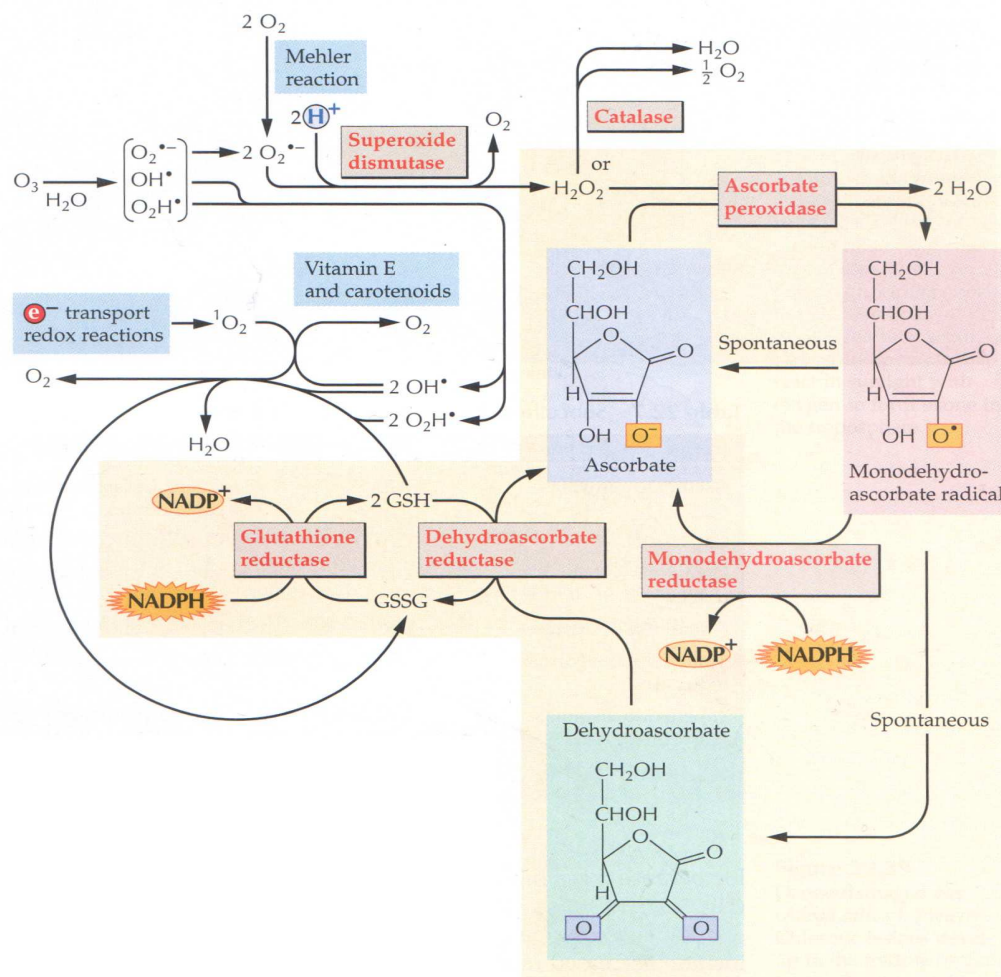
NADPH se podílí na biosyntéze mastných kyselin, isoprenoidů, fytohormonů a osmoticky aktivních látek. Je také součástí biosyntézy aromatických aminokyselin, fenylypropanoidů a obranných látek rostlin, vznikajících z produktů šikimátové dráhy [3].

$\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  se jako prekurzory signálních molekul podílejí na přenosech signálů. Všechny známe signální molekuly odvozené od  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  sdílejí podobnou strukturu, jejíž základ tvoří ADP-ribosa, vznikající odštěpením nikotinamidu prekurzorových molekul. Na vzniku signálních molekul se podílí jen oxidované formy pyridinových nukleotidů. Na přenosu signálu mohou deriváty  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  participovat modifikací cílové molekuly (navázání mono-ADP-ribosy na cílový protein vede k inhibici jeho funkce, nebo navázáním poly-ADP-ribosy má významnou roli při regulaci transkripce či dělení buněk. Také se deriváty  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  podílejí na generování malých signálních molekul. Zdá se, že funkce všech zatím známých druhů je spjata se signalizací v souvislosti s  $\text{Ca}^{2+}$ . I samotná ADP-ribosa spouští přísun vápenatých iontů do cytoplasmu aktivací  $\text{Ca}^{2+}$  iontového kanálu v plasmatické membráně. Jinou významnou molekulou související ze signalizací  $\text{Ca}^{2+}$  ionty je např. další derivát  $\text{NADP}^+$ , a to NAADP (nikotinadenindinukleotidfosfát) [2].

V souvislosti s detoxifikačními procesy je přítomnost NADPH nezbytná pro fungování askorbát-glutathionového cyklu (Halliwell-Asadaova cyklu) [3]. Tento cyklus je složený ze sady antioxidačních látek jako jsou askorbát, glutathion, vitamin E či karotenoidy, a také z enzymů, z nichž některé ke své funkci NADPH vyžadují [4]. Askorbát-glutathionový cyklus je znázorněn na obr. č. 1, str. 2.

Hlavní rolí tohoto cyklu je zbavovat buňky reaktivních forem kyslíku (ROS-reactive oxygen species), mezi které patří superoxidový radikál ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a hydroxylový radikál ( $\text{HO}^{\bullet}$ ). Tyto látky jsou pro buňky na jedné straně vysoce

cytotoxické, ale také se účastní obranných reakcí rostlin, mohou např. přímo usmrtit patogenu [4]. Reaktivní formy kyslíku vznikají převážně jako vedlejší produkty v aerobním metabolismu, avšak jsou také produkovány membránově vázanou NADPH-oxidase jako součást rané odpovědi buňky na stres [4].



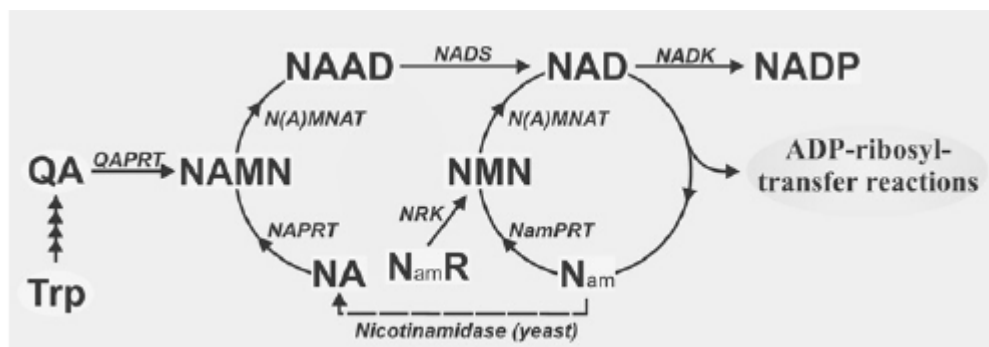
**Obr. č. 1:** Schematické znázornění antioxidačního systému v buňkách rostlin, skládajícího se z antioxidačních látek (askorbát, glutathion, vitamin E, karotenoidy a další) a antioxidačních enzymů. Askorbát-glutathionový cyklus je zvýrazněn žlutě. Superoxidové radikály  $O_2^{\bullet-}$  jsou odstraňovány pomocí superoxiddismutasy za vzniku peroxidu vodíku. Ten je buď přeměněn katalasou na vodu a  $O_2$ , anebo pouze na vodu při oxidaci askorbátu askorbátperoxidase. Askorbát může být regenerovaný dvěma způsoby, a to buď pomocí monodehydroaskorbátreduktasy vyžadující  $NADPH$ , anebo dehydroaskorbát, na který se monodehydroaskorbát spontánně mění, může reagovat s glutathionem (GSH) za vzniku askorbátu a oxidovaného glutathionu (GSSG). Tato reakce je katalyzována

*dehydroaskorbátreduktasou. GSSG je redukováný glutathionreduktasou, která opět vyžaduje NADPH. Singletový kyslík a hydroxylové radikály jsou eliminovány nejen v askorbát- glutathionovém cyklu, ale také i pomocí neenzymatických antioxidantů, vitaminu E a karotenoidů [4].*

Dalšími látkami podílejícími se na udržování redoxní homeostázy jsou thioredoxiny. Tyto proteiny jsou redukovány NADPH-dependentní thioredoxinreduktasou, přičemž redukované thioredoxiny pak mohou sloužit k redukci cílových proteinů [5].

Termín redoxní stav se obvykle používá k popsání poměru  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  v buňce. Redoxní stav uvnitř buněk má vliv na mnohé metabolické, signalizační a transkripční procesy [2]. Rostliny mají vyvinuté receptory vnímající změny redoxního stavu, které fungují jako senzory změn okolního prostředí a současně spouštějí mechanismus uvádějící do chodu redoxní změny vedoucí k ovlivnění exprese genů a funkce buněk. Tyto mechanismy se v rostlinách vyvinuly jako kompenzace neschopnosti pohybu a regulace vnitřní teploty [6].

Vzhledem k tomu, že při účasti  $\text{NADP}^+$  na redoxních reakcích (přeměna mezi oxidovanou a redukovanou formou - $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ) nedochází k jeho úbytku, potřeba *de novo* syntézy pramení z účasti  $\text{NADP}^+$  na signalizačních reakcích a taktéž je nevyhnutelná při buněčném dělení [2].  $\text{NADP}^+$  je syntetizováno *de novo* biosyntézou z chinolinové kyseliny vznikající u rostlin a bakterií z L-aspartátu, u živočichů z L-tryptofanu. Chinolinová kyselina je dále chinolinátfosforibosyltransferasou přeměněna na NAMN (mononukleotid kys. nikotinové) a dalšími 2 kroky vzniká  $\text{NAD}^+$ . Ke vzniku  $\text{NADP}^+$  dochází po fosforylaci  $\text{NAD}^+$  NAD-kinasou. Další možnost syntézy vede přes sběrnou biosyntetickou cestou, která recykluje degradační produkty, především kyselinu nikotinovou a nikotinamid [2,6]. Oba způsoby biosyntézy jsou schématicky znázorněny na obr. č. 2, str. 4.



**Obr. č. 2:** Schéma znázorňující biosyntetické dráhy NADP<sup>+</sup>. Z L-tryptofanu (Trp) u živočichů nebo z L-aspartátu v rostlinách je přes vícero kroků generována kyselina chinolinová (QA), která je následně proměněna chinolinátfosforibosyltransferasou (QAPRT) na NAMN (kyselá forma nikotinmononukleotidu). Ten je dále transformován pomocí N(A)MNAT (NA/Na mononukleotidadenylyltransferasa) na nikotinadenindinukleotid (NAAD). Z NAAD vzniká pomocí NAD-synthetasy (NADS) NAD<sup>+</sup>. To je fosforylováno NAD-kinasou (NADK) za vzniku NADP<sup>+</sup>. Další cesta syntézy probíhá z recyklované nikotinové kyseliny (NA) nebo nikotinamidu (Nam). NA je nikotinofosforibosyltransferasou (NAPRT) přeměněna na NAMN (mononukleotid kyseliny nikotinové), který se dále účastní výše popsaných reakcí. Nam (nikotinamid) je nikotinamidfosforibosyltransferasou (NamPRT) přeměněn na nikotinmononukleotid (NMN), z něhož poté vzniká NAD<sup>+</sup> pomocí N(A)MNAT [2].

V organismu je vícero zdrojů poskytujících redukovaný nukleotid NADPH. U fotosyntetizujících organismů je významným zdrojem NADPH proces probíhající na membránách thylakoidů v chloroplastech, při kterém dochází k přeměně energie elektromagnetického záření na energii chemickou. NADPH poskytované fotosyntézou je následně využito zejména k syntéze cukrů v Calvinově cyklu [4]. Dalším významným poskytovatelem NADPH je pentosový cyklus, který je lokalizovaný v cytoplazmě. Hlavními enzymy produkujícími NADPH v tomto cyklu jsou glukosa-6-fosfátdehydrogenasa a (EC 1.1.1.49; dále jen G6PDH) a 6-fosfoglukonátdehydrogenasa (EC 1.1.1.44) [2,7]. Kromě těchto systémů se v buňce na produkci redukčních ekvivalentů v podobě NADPH podílejí i další enzymy, jako např. NADP-dependentní isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační) (NADP-ICDH, EC 1.1.1.42), NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxaloacetát dekarboxylační) (EC 1.1.1.40, NADP-ME) a nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (EC 1.2.1.9, NP-GPD), kterými se tato práce zabývá.

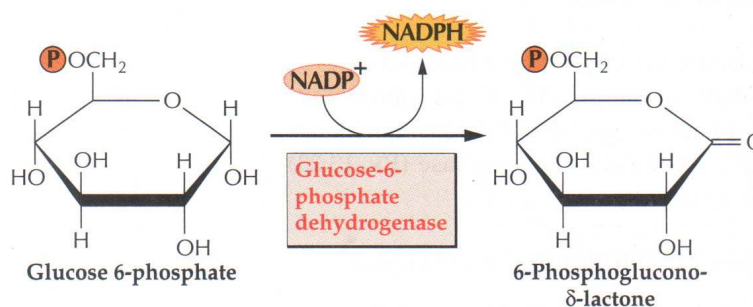


Kromě enzymů produkujících NADPH byl také sledován enzym, který jej spotřebovává. Tímto enzymem je šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25, SDH). SDH je součástí šikimátové dráhy zodpovědného za syntézu aromatických aminokyselin v rostlinách. Z těchto aminokyselin pak vychází syntéza široké škály látek [8].

## 1.2 NADP-dependentní enzymy poskytující NADPH

### 1.2.1 Glukosa-6-fosfatdehydrogenasa

Systematicky se G6PDH nazývá D-glukosa-6-fosfát:NADP<sup>+</sup> 1-oxidoreduktasa. G6PDH katalyzuje oxidativní přeměnu D-glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukono- $\delta$ -lakton v přítomnosti NADP<sup>+</sup>. [4]:

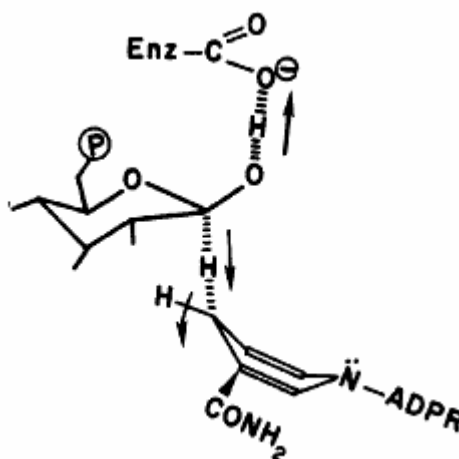


G6PDH je ve stroma chloroplastů i v cytosolu součástí oxidativního pentosafosfátového cyklu, kde katalyzuje první a zároveň rychlost limitující reakci tohoto cyklu, jelikož reakce katalyzovaná G6PDH probíhá v organismu pouze v jednom směru [9]. Současně je také jedním ze dvou enzymů pentosafosfátového cyklu, které produkují NADPH. Význam G6PDH spočívá v tom, že je důležitým poskytovatelem NADPH, ribulosa-5-fosfátu a erytrósa-4-fosfátu. Získané NADPH je využito v mnohých biosyntetických procesech, jako je syntéza mastných kyselin, isoprenoidů, aromatických aminokyselin, či také rostlinných hormonů, derivátů alkaloidů odvozených od histidinu a purinu a různých sekundárních metabolitů [10,11]. Ribulosa-5-fosfát se podílí na biosyntéze nukleotidů [10]. Ukázalo se také, že G6PDH se poskytováním NADPH podílí na asimilaci dusíku [12] a že má také významný podíl na obraně buněk vůči oxidativnímu stresu. Souvislost funkce tohoto enzymu s obranou proti oxidativnímu stresu byla nejprve zjištěna u savců [13]. Později byla také v rostlinách nalezena spojitost G6PDH s aktivací obrany vůči enviromentálnímu stresu [14]. Produkci NADPH G6PDH

zásobuje askorbát-glutathionový cyklus v chloroplastech a peroxisomech, který slouží jako obranný mechanismus proti oxidativnímu stresu [15].

Výskyt G6PDH je velmi široký. Byla nalezena v mnoha organizmech v každé říši. Přítomnost G6PDH byla zjištěna v cytosolu, peroxisomech a chloroplastech [9,15,16]. Izolace a charakterizace G6PDH byla provedena např. z listů koriandru setého (*Coriandrum sativum*). Enzym měl pH optimum 8,0, relativní molekulovou hmotnost 74 400 a optimální teplotu 30°C. Michaelisova konstanta tohoto enzymu pro D-glukosa-6-fosfát byla 0,116 mM a pro NADP<sup>+</sup> 0,026 mM [17].

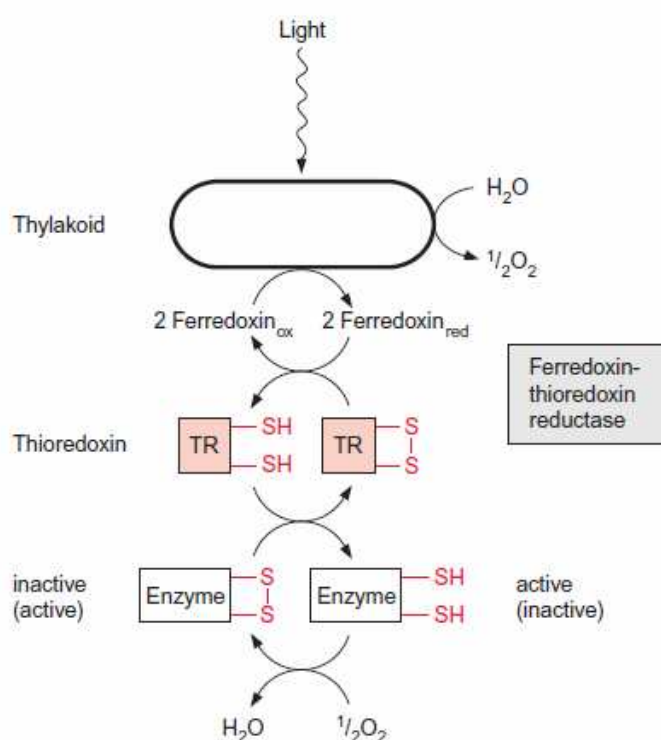
G6PDH katalyzuje přenos vodíkového iontu z uhlíku C<sub>1</sub> glukosa-6-fosfátu za vzniku 6-fosfoglukono-δ-laktonu. Glukosa-6-fosfát, cyklický semiacetál, jehož uhlík je v oxidačním stavu aldehydu, je tak oxidován na cyklický ester (lakton) [18]. Mechanismus této reakce probíhá s využitím His-240, který je hlavní bází odebírající proton z C<sub>1</sub> hydroxylové skupiny glukosa-6-fosfátu. Po odebrání protonu vzniká na histidinu pozitivní náboj, který je stabilizován karboxylovou skupinou Asp-177 (obr. č.3) [19].



**Obr. č. 3:** Mechanismus reakce katalyzované G6PDH [20].

Oxidační pentosafosfátový cyklus, jehož G6PDH součástí, se nachází v chloroplastech, kde je však umístěn i redukční pentosofosfátový cyklus (Calvinův cyklus). Funkce těchto dvou cyklů jsou protichůdné, proto je nutné, aby oba cykly neprobíhaly současně. Toho je dosaženo pomocí regulace klíčových enzymů obou cyklů světelným zářením. Signál „světlo“ je zprostředkován fotosyntetickými elektronovými transportéry feredoxinem a thioredoxinem. Elektrony jsou z feredoxinu na thioredoxin přeneseny feredoxin-thioredoxinreduktasou. Redukovaný thioredoxin redukuje enzym,

čímž ho převede do neaktivní formy (obr. č. 4). Thioredoxiny tvoří rodinu malých proteinů obsahujících dva cysteiny blízko sebe, takže oxidovaná forma obsahuje dva cysteiny spojené disulfidovým můstkem a redukovaná forma obsahuje dvě SH-skupiny [21]. Chloroplastový enzym je aktivován zvýšenou koncentrací  $\text{NADP}^+$ . Cytosolová forma G6PDH je silně inhibovaná NADPH, ale byly zjištěny i další inhibitory. U rostlin je to např. reverzibilní inhibice dithiothreitem, u kvasinek byla pozorován kompetitivní inhibice D-glukosamin-6- fosfátem a palmitoyl-koenzymem A [11].



**Obr. č. 4:** Schéma regulace chloroplastových enzymů thioredoxinem. Světlo slouží jako signál aktivace a inaktivace enzymů přítomných v chloroplastech. Elektrony z fotosyntézy jsou použity na redukci feredoxinu. Z feredoxinu jsou elektrony přeneseny na thioredoxin pomocí feredoxin-thioredoxinreduktasy. Redukovaný thioredoxin redukuje oxidovanou formu enzymu G6PDH, čímž se z aktivní formy stane neaktivní [21]. Pro jiné enzymy může tento systém naopak sloužit k převedení do aktivní formy.

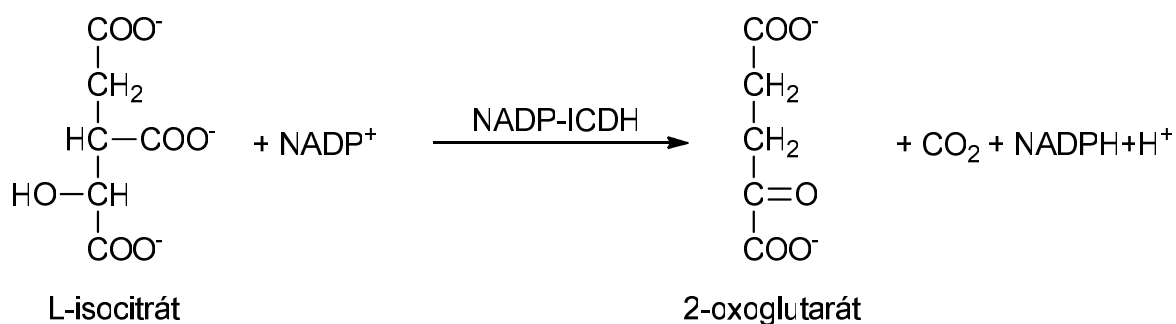
Aktivita G6PDH byla v souvislosti ze stresem sledována v různých modelových rostlinách. Bylo zjištěno, že tento enzym se podílí na odpovědi na stres solí, chladem a těžkými kovy [12,14,22,23]. Gen G6PDH patří mezi pět genů pšenice, které jsou

aktivovány při rané odpovědi po vystavení solnému stresu [21]. Vliv soli byl také sledován u rostliny *Carex moorcroftii*. Ukázalo se, že G6PDH má důležitou úlohu při vylučování sodíkových iontů z cytoplazmy. Eliminace  $\text{Na}^+$  iontů představuje hlavní mechanismus, kterým se rostliny adaptují na přítomnost zvýšené koncentrace soli. G6PDH se na tomto procesu podílí poskytováním NADPH pro NADPH-oxidasu generující  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Peroxid vodíku slouží jako signál zvyšující aktivitu plazmatické  $\text{H}^+$ -ATPasy a účinnost antiporteru  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [14]. Při dlouhodobém solném stresu se G6PDH díky souvislosti s NADPH-oxidasou podílí jak na zachovávání redukováného glutathionu tak na hromadění peroxidu vodíku.  $\text{H}_2\text{O}_2$  jako signální molekula zvyšuje aktivitu G6PDH, glutathionreduktasy a glutathionperoxidasy, čím dochází ke zvýšení činnosti glutathionového cyklu a ve výsledku i ke zvýšení množství glutathionu [24]. G6PDH poskytuje NADPH i pro nitrátreduktasu, která produkuje NO, nezbytnou látku pro přizpůsobení se vyšším koncentracím soli [12]. Zvýšení aktivity G6PDH bylo také zaznamenáno v klíčících semenech hrachu vystavených kadmii. Těžké kovy způsobují poškození dýchacího řetězce, což se projevuje sníženou dostupností ATP. Je možné, že aktivita G6PDH je zvýšená proto, aby kompenzovala snížení dostupné energie, produkcí redukčních ekvivalentů podobně jak je tomu při zrání semen, kde je aerobní respirace snížena [25].

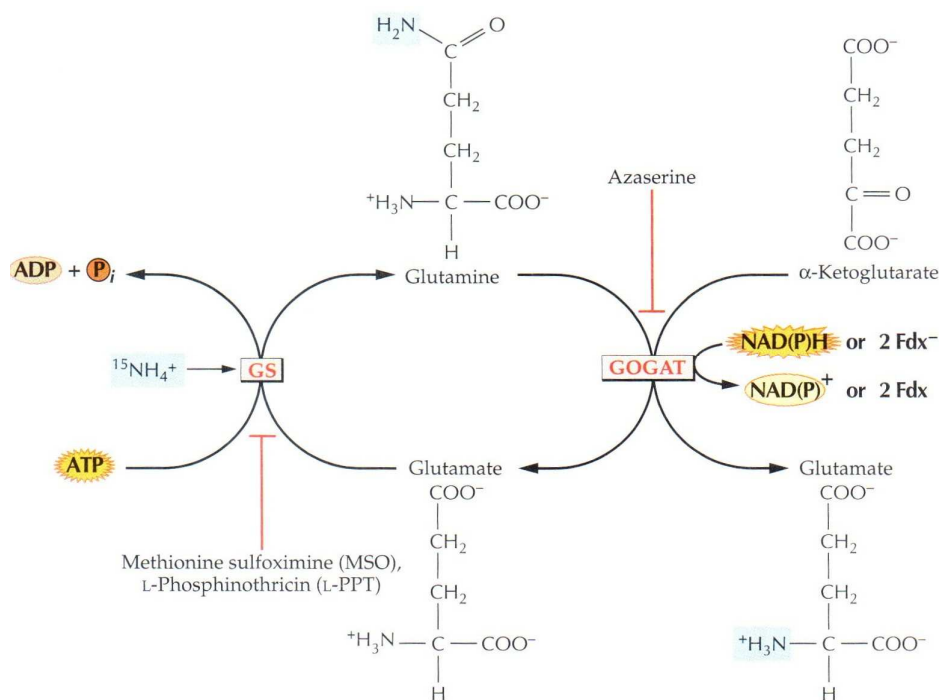
Aktivita G6PDH byla zvýšena také v listech žita vystaveného nízké teplotě ( $4^\circ\text{C}$ ). Po zvýšení teploty na  $22^\circ\text{C}$  došlo k zpětnému poklesu aktivity tohoto enzymu. V listech žita vystavených chladu byly rovněž nalezeny vyšší koncentrace antioxidantů a vysoká kapacita udržovat tyto antioxidanty v redukované formě. Z výsledků této studie vyplývá, že oxidační pentosafosfatový cyklus je možný nefotosyntetický zdroj NADPH [26].

### 1.2.2 NADP-isocitrátdehydrogenasa (dekarboxylační)

Systematicky se tento enzym nazývá isocitrát: NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa (dekarboxylační). Jeho úlohou je katalyzovat oxidační dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát v přítomnosti NADP<sup>+</sup>, za vzniku  $\text{CO}_2$  a NADPH [27]:



V rostlinách NADP-ICDH produkcí 2-oxoglutarátu spojuje metabolismus dusíku a uhlíku. Produkci 2-oxoglutarátu totiž poskytuje uhlíkové kostry pro asimilaci anorganického dusíku. K tomuto procesu dochází v GS/GOGAT cyklu (obr. č. 5, str. 10), ve kterém glutaminyntetasa (GS EC 6.3.1.2) katalyzuje kondenzaci L-glutamátu s amonným iontem za vzniku L-glutaminu. Dále dochází k přenosu amidové skupiny z L-glutaminu na 2-oxoglutarát za vzniku 2 molekul L-glutamátu. Tato reakce je katalyzovaná glutamátsynthasou (GOGAT, EC 1.4.1.7 nebo EC 1.4.1.14). Jedna molekula L-glutamátu vznikající v tomto cyklu se vrací k regeneraci substrátu GS, druhá molekula L-glutamátu je využita k syntéze dalších dusíkatých látek jako jsou nukleové kyseliny, chlorofyly a další aminokyseliny [28]. Za hlavního poskytovatele 2-oxoglutarátu pro biosyntézu dusíkatých látek byla vždy považována NAD-ICDH (EC 1.1.1.41) citrátového cyklu. V současnosti, je zastáván názor, že také NADP-ICDH slouží jako alternativní cesta poskytování této oxokyseliny v případě, že je 2-oxoglutarátu potřeba zvýšené množství [28]. Další možnou rolí NADP-ICDH je poskytování NADPH pro redoxní signalizaci a udržování homeostáze v odpovědi na oxidační stres [29].



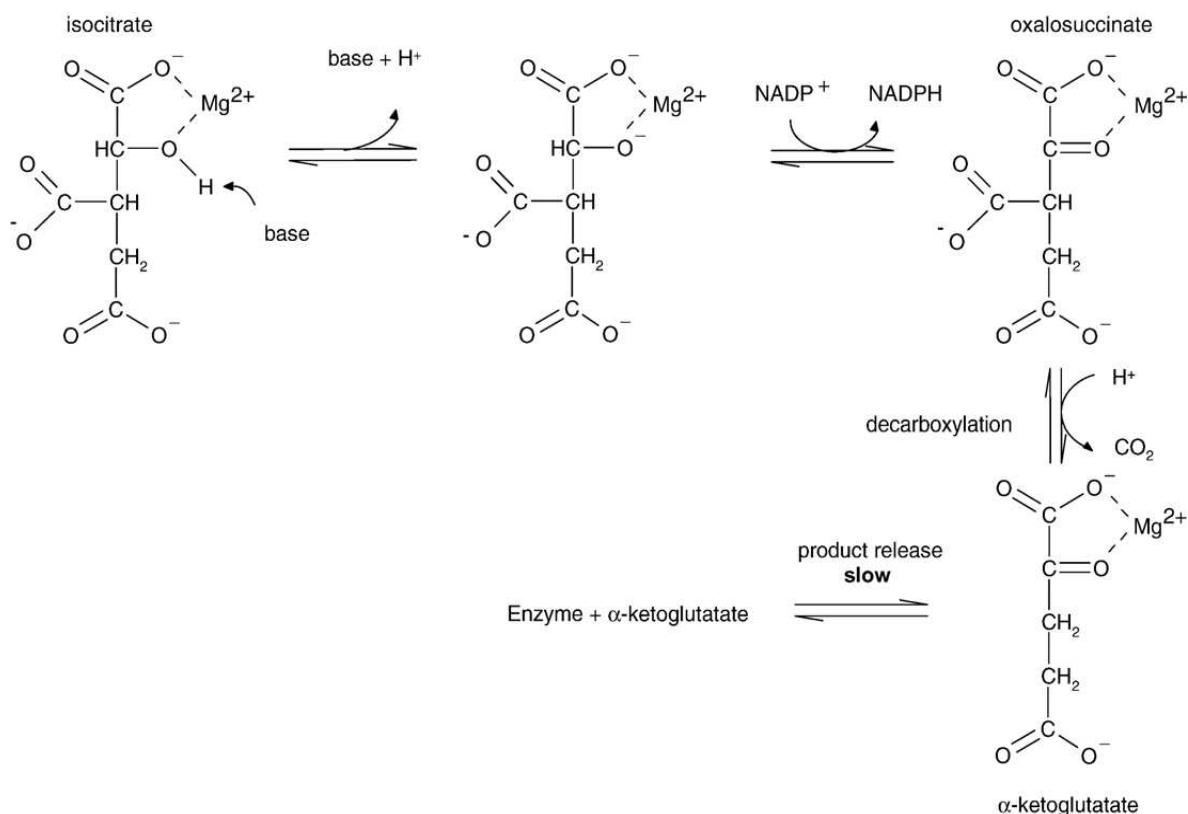
**Obr. č. 5:** GS/GOGAT cyklus, pomocí kterého je v rostlinách asimilován anorganický dusík v podobě  $\text{NH}_4^+$  iontů, které jsou vázány GS na L-glutamát za vzniku L-glutaminu. Amidová skupina L-glutaminu je poté přenesena na 2-oxoglutarát za vzniku dvou molekul L-glutamátu [4].

Výskyt NADP-ICDH je široký. Byl nalezen u mikroorganismů, rostlin, živočichů i člověka. V rámci buněčných kompartmentů byla jeho přítomnost nalezena v cytosolu, mitochondriích, chloroplastech, ale také v peroxisomech [15,30]. Byl izolován a charakterizován například ze sazenic borovice (*Pinus spp.*), kde byla přítomna pouze cytosolová izoforma. Enzym měl relativní molekulovou hmotnost 95 000 a vykazoval typickou kinetiku Michaelis-Mentenové s  $K_m$  80  $\mu\text{M}$  pro isocitrát a 10  $\mu\text{M}$  pro  $\text{NADP}^+$  [28].

Obecný mechanismus reakce katalyzované NADP-ICDH se sestává z více kroků, znázorněných na obr. č. 6, str. 11. Prvním krokem je navázání substrátu,  $\text{NADP}^+$  a iontu kovu ( $\text{Mg}^{2+}$ ), čímž dojde k vytvoření komplexu enzym-substrát. Následuje redukční dehydrogenace, při které vzniká oxalosukcinát a NADPH. Dalším krokem je dekarboxylace při které vzniká 2-oxoglutarát a uvolňuje se  $\text{CO}_2$ . Posledním krokem, a zároveň i krokem limitujícím rychlost celého procesu, je uvolnění produktu z enzymu.

Mechanismus reakce katalyzované NADP-ICDH byl studován na enzymu izolovaném z bakterie *Desulfotalea psychrophila* [31].

Enzym je inhibován produkty reakce, a to 2-oxoglutarátem a NADPH. Byla zaznamenána i inhibice dalšími metabolity jako např. ATP a citrátem, avšak tato inhibice nemá při fyziologických podmínkách skoro žádný regulační význam [32].



**Obr. č. 6:** Mechanismus reakce katalyzované NADP-ICDH popsaný u enzymu izolovaného z bakterie *Desulfotalea psychrophila* [31].

Aktivita NADP-ICDH byla v souvislosti se stresem studována mnohokrát. Zvažuje se, že funkce tohoto enzymu je důležitá především v případě poškození pentosafosfátového cyklu. Tuto hypotézu podporují i výsledky získané sledováním aktivity NADPH generujících enzymů v nodulech hrachu vystavených stresu zatopením. Zatímco aktivita G6PDH a dalších NADPH generujících enzymů poklesla, aktivita NADP-ICDH zaznamenala nárůst [3,30,33].

Výzkum, který byl proveden na rostlinách *Arabidopsis thaliana* také naznačuje možnou účast NADP-ICDH na redoxní signalizaci po napadení rostliny patogenem [34].

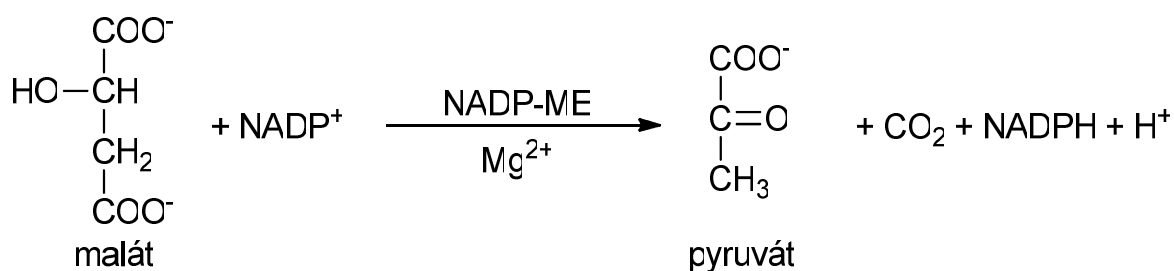
Expres NADP-ICDH se jako jedna z prvních (spolu se čtyřiceti dalšími transkripty) zvyšuje v kořenech cizrny beraní (*Cicer arietinum* L.) vystavených soli [35].

Důležitost NADP-ICDH jako poskytovatele uhlíkové kostry pro asimilaci dusíku v podmínkách stresu byla zjištěna v kořenech rýže vystavených nízkým teplotám (20 °C na rozdíl od optimálních 30 °C). Tento typ stresu způsobil současný nárůst aktivity NADP-ICDH a aktivity glutamátsyntetasy [36].

V různých rostlinách byly sledovány také účinky těžkých kovů, hliníku či nedostatku fosfátu na aktivitu NADP-ICDH. V listech fazole vystavené kadmiu byla zjištěna zvýšená aktivita NADP-ICDH [37]. V listech pomela (*Citrus grandis*) vystavených současně působení hliníku a fosfátu došlo také k nárůstu aktivity NADP-ICDH [38]. Při nedostatku fosfátu jsou rostliny schopny adaptovat se např. vylučováním organických kyselin do půdy, které půdu okyselí a zároveň chelatují ionty kovů, což rostlinám umožní přijímat těžko rozpustný fosfát z půdy více efektivně [39,40]. Přítomnosti hliníku v půdě se rostliny mohou přizpůsobit produkcí organických kyselin, zejména citrátu, oxaloacetátu a malátu. Tyto organické kyseliny jsou schopny vytvářet s  $\text{Al}^{3+}$  ionty stabilní komplexy [41].

### 1.2.3 NADP-malátdehydrogenasa (oxaloacetat-dekarboxylační)

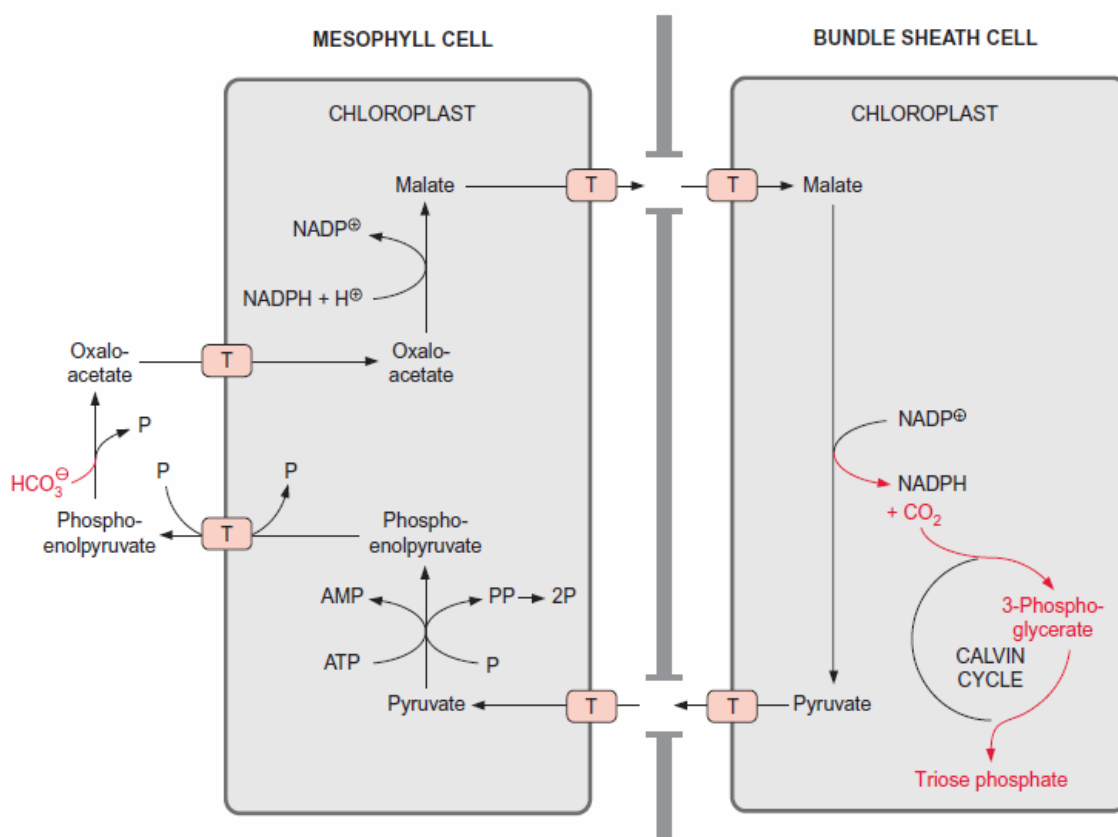
Systematický název tohoto enzymu je L-malát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa. V přítomnosti NADP<sup>+</sup> jako koenzymu katalyzuje oxidační dekarboxylaci L-malátu na pyruvát, CO<sub>2</sub> a NADPH. Pro průběh této reakce je také nezbytná přítomnost kofaktorů, mezi nejefektivnější patří ionty  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  [42].



Výskyt NADP-ME je značně rozsáhlý. Enzym byl nalezen jak v prokaryotických organizmech, tak i v rostlinách a živočiších. V buněčných kompartmentech se NADP-ME vyskytuje v plastidech a v cytosolu [10]. V různých rostlinných tkáních je také hojně



zastoupen, nachází se v květech, plodech, semenech i ve speciálních zásobních orgánech [43]. Zatímco nefotosyntetická isoforma NADP-ME se nachází ve všech typech rostlin ( $C_3$ ,  $C_4$  a CAM), v rostlinách  $C_4$  a CAM se navíc vyskytuje isoforma NADP-ME, která má důležitou úlohu ve fotosyntéze, v poskytování  $CO_2$  pro Rubisco přímo v místě působení Calvinova cyklu. V  $C_4$  rostlinách dochází k prefixaci atmosférického  $CO_2$  v mesofylových buňkách pomocí fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC, EC 4.1.1.31) do  $C_4$  kyselin, které jsou následně dekarboxylovány v sousedních buňkách věnčitých;  $CO_2$  uvolněné při dekarboxylaci je přímo využito Calvinovým cyklem. Existují tři různé způsoby uvolnění  $CO_2$  ve věnčitých buňkách. U většiny  $C_4$  rostlin dochází k uvolnění  $CO_2$  v chloroplastech věnčitých buněk dekarboxylací malátu za vzniku pyruvátu. Tuto reakci katalyzuje NADP-ME, a proto se příslušné  $C_4$  rostliny nazývají NADP-ME typu (obr. č. 7, str. 14). Zároveň je při této reakci produkováno NADPH. U rostlin NAD-ME typu dochází k dekarboxylaci malátu v mitochondriích věnčitých buněk a reakce je doprovázena redukcí  $NAD^+$ . Fosfoenolpyruvátkarboxykinasový typ rostlin dekarboxyluje oxaloacetát v cytoplasmě věnčitých buněk. CAM rostliny žijí v oblastech velkého sucha, proto si vyvinuly strategii, která jim pomáhá lépe hospodařit s vodou. Fixace  $CO_2$  v tomto typu rostlin probíhá v noci, kdy je okolní teplota oproti denní výrazně nižší. Rostlina tak zabrání nadměrné ztrátě vody transpirací při otevření průduchů.  $CO_2$ , získané přes noc, je fixováno ve formě kyseliny (malátu) a uloženo ve vakuole do následujícího dne. Pak dojde k dekarboxylaci malátu pomocí NADP-ME a tím k uvolnění  $CO_2$ , který následně vstupuje do Calvinova cyklu [21]. Pyruvát produkový NADP-ME, může být také využit dýchacím řetězcem pro získání energie ve formě ATP [44]. Nefotosyntetický NADP-ME se spolu s PEPC podílí na udržování intracelulárního pH a je také možným poskytovatelem NADPH pro syntézu mastných kyselin, ligninů a flavonoidů [44, 45]. Tento enzym se poskytováním NADPH také podílí na biosyntéze steroidů, terpenoidů a derivátů alkaloidů [10].



**Obr. č. 7:** Mechanismus fixace  $\text{CO}_2$  u  $\text{C}_4$  rostlin NADP-ME typu (nacházející se např. u kukuřice).

V cytosolu mesofylových buněk probíhá fixace  $\text{HCO}_3^-$  reakcí s fosfoenolpyruvát, za vzniku oxaloacetátu. Vzniklý oxaloacetát je přenesen do chloroplastů, kde z něho vzniká malát. Malát je poté transportován do chloroplastů věnčitých buněk, kde probíhá jeho dekarboxylace katalyzovaná NADP-ME. Při této reakci vzniká pyruvát,  $\text{CO}_2$  a NADPH.  $\text{CO}_2$  je využito Calvinovým cyklem. Pyruvát je transportován zpět do chloroplastů mesofylových buněk, kde je fosforylován na fosfoenolpyruvát. Fosfoenolpyruvát se vrací zpět do cytosolu. (T=translokátor) [21].

Charakterizace a izolace NADP-ME byla provedena například z listů rostliny *Aptenia cordifolia*, která je konstitutivní CAM rostlinou. Byly nalezeny dvě isoformy se stejnou relativní molekulovou hmotností 72 000 a odlišnými pI (6,1 pro kořenovou a 6,4 pro isoformu přítomnou v listech). Enzym vykazoval optimální aktivitu při pH 7,3. Hodnota  $K_m$  NADP-ME pro L-malát byla 1,1 mM a pro  $\text{NADP}^+$  13  $\mu\text{M}$ . Enzym byl silně kompetitivně inhibován L-aspartátem, oxaloacetátem a fosfoenolpyruvát [46].

Regulace NADP-ME závisí na konkrétní isoformě a druhu rostliny [3]. V rostlinách tabáku je NADP-ME regulovaná pomocí makroergických sloučenin, jako ATP, GTP a ADP [47]. Dalšími látkami podílejících se na regulaci tohoto enzymu v rostlinách tabáku jsou meziprodukty citrátového cyklu [48].

Jednou z dalších důležitých úloh, kterou NADP-ME zajišťuje, je poskytování NADPH potřebného při obranných reakcích proti stresu. Vliv různých typů stresu na aktivitu tohoto enzymu byl studován v několika modelových systémech. Zdá se, že v případě stresových podmínek ovlivňujících hospodaření s vodou (sucho, zasolení, chlad) NADPH slouží pro biosyntézu osmoticky aktivních látek jako je prolin, manitol, či glycinbetain. Navíc může NADP-ME modulovat metabolismus organických kyselin ve svěřacích buňkách, tvořících průduchy, čímž tento enzym kontroluje uzavírání průduchů v podmínkách stresu suchem [3,48,49,50].

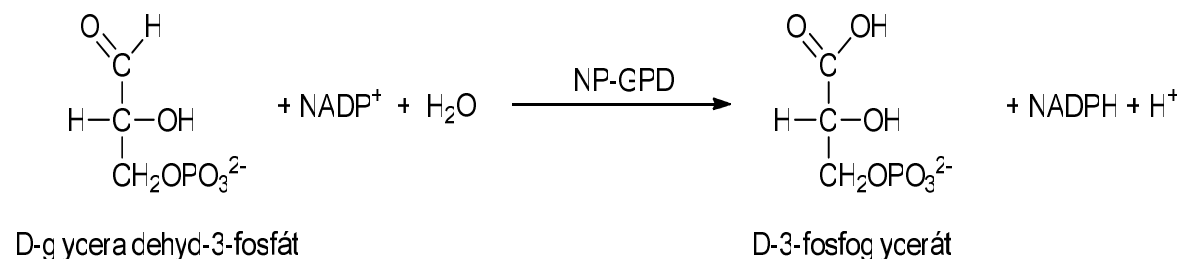
Účinek kadmia na aktivitu NADP-ME byl studován v rostlinách fazole. Koncentrace kadmia, kterým byly pokusné rostliny vystaveny odpovídaly koncentracím běžně se vyskytujícím v životním prostředí. V tomto pokusu byla v rostlinách vystavených kadmiu zaznamenána zvýšená aktivita NADP-ME a dalších NADP-dependentních enzymů. Předpokládá se, že NADPH získané reakcí katalyzovanou NADP-ME napomáhá k ustálení redoxní rovnováhy při raném obraném mechanismu [51].

Zvýšení aktivity NADP-ME bylo také zaznamenáno v hyperhydrických výhoncích hvozdíku (*Dianthus caryophyllus*), vystavených nedostatku kyslíku. Za těchto podmínek dochází k indukci fermentačního metabolismu a k současnému snížení aktivity pyruvátkinasy. NADP-ME společně s PEPC (fosfoenolpyruvátcarboxylasa) mohou reakci katalyzovanou pyruvátkinasou (přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát) obejít vedlejší drahou [52].

Nárůst aktivity NADP-ME byl zaznamenán i v rostlinách vystavených ozónu či v rostlinách tabáku vystavených virové infekci, konkrétně *A viru bramboru* a *Y viru bramboru* [53,54,55].

### 1.2.4 Nefosforylační glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenasa

Systematicky se tento enzym nazývá D-glyceraldehyd-3-fosfát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa. Jeho funkce je katalyzovat ireverzibilní oxidaci D-glyceraldehyd-3-fosfátu na 3-fosfoglycerát za současné redukce NADP<sup>+</sup> na NADPH:



Na rozdíl od glyceraldehydfosfátdehydrogenasy, která je součástí glykolýzy, tento enzym nevyžaduje Pi jako substrát.

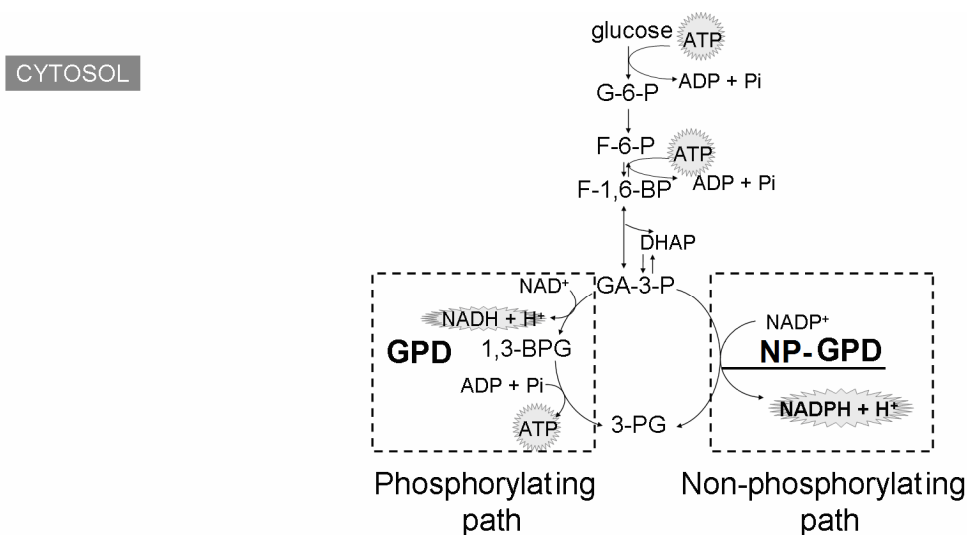
NP-GPD hraje významnou roli v člunkovém systému, který slouží k nepřímému transportu NADPH generovaného fotosyntézou z chloroplastů do cytosolu. Při tomto procesu je nejprve glyceraldehyd-3-fosfát poskytovaný Calvinovým cyklem přenesen z chloroplastu do cytosolu pomocí chloroplastového triosafosfátového/fosfátového translokátoru. V cytosolu je glyceraldehyd-3-fosfát oxidován pomocí NP-GPD, přičemž vzniká NADPH [56], které může být použito pro různé biosyntetické procesy [57]. Tato úloha NP-GPD je striktně vázaná na fotosyntézu v rostlinných buňkách, avšak přítomnost NP-GPD byla zaznamenána i v nefotosyntetických tkáních. V těchto tkáních může NP-GPD spojovat produkci NADPH, potřebného pro anabolické reakce, s glykolýzou [58].

Izolace a charakterizace NP-GPD byla provedena např. z listů celeru. Purifikovaný enzym měl homotetramerní strukturu s molekulovou hmotností podjednotky 54 kDa. Enzym vykazoval vysokou specifitu k substrátu (pro NADP<sup>+</sup> bylo K<sub>m</sub> 7 μM a pro glyceraldehyd-3-fosfát bylo K<sub>m</sub> 127 μM). Nejvyšší aktivitu měl enzym při pH 8,5 [59].

NP-GPD se podílí na odpovědi vůči oxidativnímu stresu. Zvýšená aktivita tohoto enzymu byla nalezená v semenech rostlin kukuřice a pšenice vystavených oxidativním podmínkám v podobě methylviologenu. V této studii bylo zjištěno, že enzym NP-GPD je relativně chráněn před inaktivací v přítomnosti oxidativních látek, takže je pravděpodobně jedním z hlavních poskytovatelů NADPH v cytosolu [56].

NP-GPD se může také podílet na odpovědi vůči stresu způsobeného nedostatkem fosfátu. Na rozdíl od glyceralddehydfosfátdehydrogenasy, která je součástí glykolýzy, tento enzym nevyžaduje  $\text{P}_i$  jako substrát a 3-fosfoglycerát produkuje přímo (obr. č. 8). Touto cestou se předejde reakci generující ATP a tím i spotřebování dalšího  $\text{P}_i$  [60]. Aktivita NP-GPD byla v souvislosti s nedostatkem fosfátu sledována i v buněčné suspenzi rostliny *Brassica nigra*. Buňky, které rostly v podmínkách se sníženým obsahem fosfátu vykazovaly vyšší aktivitu NP-GPD než buňky s dostatečným přísunem fosfátu [61]. Avšak v listech rýže pěstované v podmínkách s nedostatkem fosfátu nebyla zaznamenána změna v relativní expresi NP-GPD, naopak byla zjištěna zvýšená relativní exprese NAD-dependentní NP-GPD. Z toho vyplývá, že využití NP-GPD k přizpůsobení se tomuto typu stresu není univerzální pro všechny rostliny [62].

Rostliny rýže vystavené stresu suchem a zatopením se vyznačovaly zvýšenou akumulací transkriptů NP-GPD. Předpokládá se, že indukce genů účastnících se glykolýzy a alkoholové fermentace (NP-GPD, enolasy, alkoholdehydrogenasy a pyruvátdekarboxylasy) je nevyhnutelné pro přizpůsobení se anaerobním podmínkám, ke kterým při stresu zatopením dochází a že zvýšení činnosti glykolýzy je jednou z prvních odpovědí na stres způsobený nedostatkem vody. Děje se tak pravděpodobně kvůli zvýšeným energetickým nárokům [63].



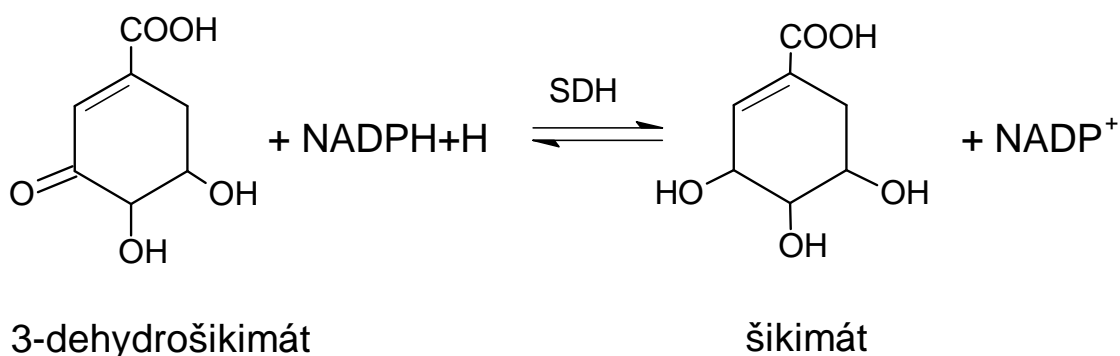
**Obr. č. 8:** Schématické znázornění reakce katalyzované NP-GPD. Tato reakce je součástí nefosforylující dráhy sloužící jako alternativa ke glykolýze, zejména při nedostatku fosforu. (1,3-BPG, 1,3-bisfosfoglycerát; DHAP, dihydroxyacetonfosfát; GA-3-P, D-glyceraldehyd-

3-fosfát; glucose, D-glukosa; G-6-P, D-glukosa-6-fosfát; GPD, glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasa; F-6-P, D-fruktosa-6-fosfát; F-1,6-BP, D-fruktosa-1,6-bisfosfát; 3-PG, 3-fosfoglycerát) [3,60].

### 1.3 NADP-dependentní enzymy spotřebovávající NADPH

#### 1.3.1 Šikimátdehydrogenasa

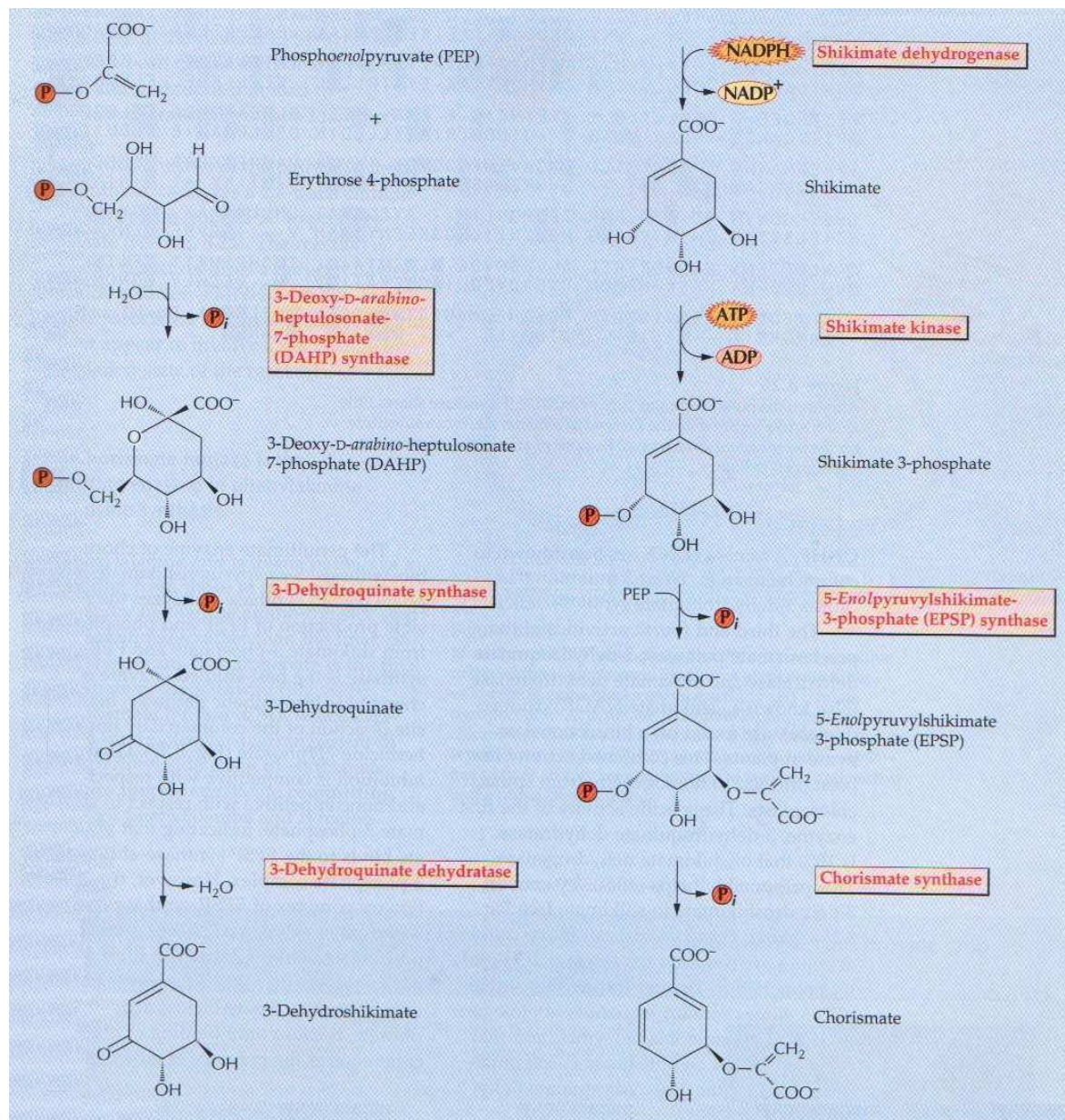
Systematicky se tento enzym nazývá šikimát:NADP<sup>+</sup> 3-oxidoreduktasa. Jeho úlohou je v přítomnosti NADPH katalyzovat reverzibilní přeměnu 3-dehydrošikimátu na šikimát.



SDH byla nalezena v rostlinách a mikroorganismech, avšak u člověka a živočichů se nevyskytuje. U rostlinné SDH byla zjištěna také další enzymová aktivita. Ukázalo se, že tento enzym slouží i jako 3-dehydrochinátdehydratasa (EC 4.2.1.10 DHD). SDH je jedním z enzymů tvořících šikimátovou dráhu. Tento cyklus je znázorněný na obr. č. 9, str. 19. Úlohou šikimátové dráhy je syntetizovat aromatické aminokyseliny (tyrosin, fenylalanin, tryptofan). Význam zmíněné dráhy však nespočívá pouze v produkci aromatických aminokyselin pro syntézu proteinů, ale i v poskytování prekurzorů pro širokou škálu různých látek produkovaných rostlinami ve velkých množstvích. Jedná se obzvlášť o fenylypropanoidy (flavonoidy, stilbeny, taniny, lignany a ligniny), ale i o další látky jako fytoalexiny, alkaloidy či glukosinoláty. Význam šikimátové dráhy dokazuje i skutečnost, že přibližně 20 % uhlíku asimilovaného fotosyntézou touto drahou prochází. Šikimátová dráha začíná reakcí fosfoenolpyruvátu s erytroza-4-fosfátem. Skládá se ze sedmi reakcí a šesti enzymů, neboť v rostlinách je třetí a čtvrtá reakce katalyzována DHD/SDH. Výslednou látkou celé dráhy je chorismát, který je společným prekursorem pro



syntézu aromatických aminokyselin. Aromatické AMK patří mezi centrální molekuly rostlinného metabolismu a pro člověka a některé živočichy jsou esenciální [3,10,21,64,65,66,].

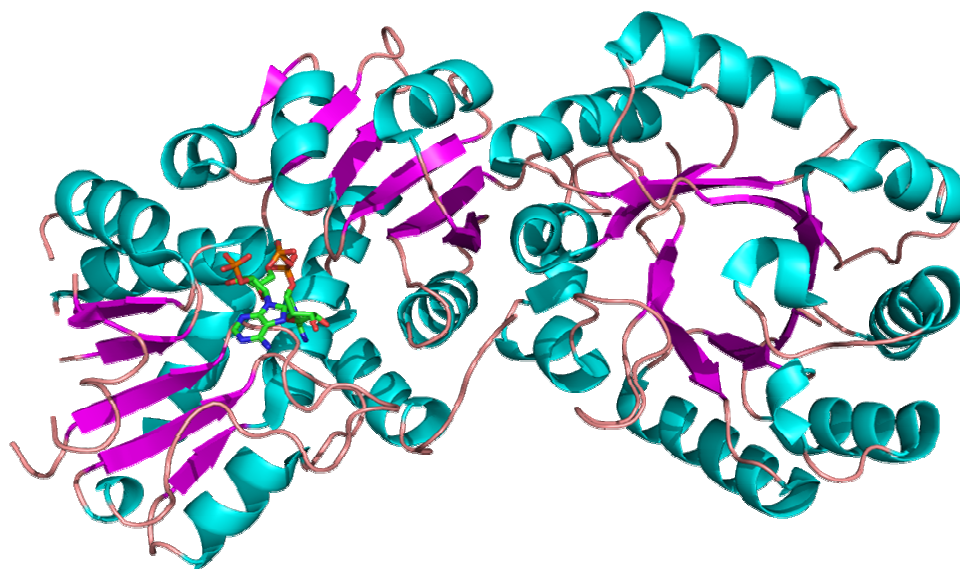


Obr. č. 9: Schématické znázornění reakcí šikimátové dráhy [4].

SDH byla nalezena v mnoha rostlinných pletivech. V rámci buňky je známa plastidová forma a cytosolová forma. Výzkum na transgenních rostlinách tabáku poukazuje na možnost, že cytosolová forma má v porovnání s plastidovou SDH v podmínkách *in vivo* odlišnou funkci [67].

SDH byla izolována a charakterizována například z listů čajovníku čínského (*Camellia sinensis* L.). SDH listů čajovníku měla pH optimum 7,7 v Tris-HCl pufru,  $K_m$  pro šikimát měla hodnotu 0,43 mM a pro  $\text{NADP}^+$  0,032 mM. Nejvyšší specifická aktivita tohoto enzymu byla zjištěna v rostoucích mladých listech [68].

Krystalová struktura tohoto enzymu byla také předmětem výzkumu. Na obr. č.10 je znázorněn model krystalové struktury komplexu DHD/SDH z rostliny *Arabidopsis thaliana* [69].



**Obr. č. 10:** Model krystalové struktury bifunkčního komplexu 3-dehydrochinátdehydratasa/ šikimátdehydrogenasa (DHD/SDH) izolovaného z houseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Modře jsou znázorněné  $\alpha$  helixy, fialově jsou znázorněné  $\beta$  skládané listy, zeleno-modře je  $\text{NADP}^+$  [69].

SDH je také enzym studovaný v souvislosti se stresem. V listech rostlin heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*) vystavených kadmiu, mědi a niklu byl zaznamenán nárůst aktivity tohoto enzymu [70, 71]. Rovněž přítomnost olova v kultivačním médiu zvýšila aktivitu SDH v listech *Vallisneria spiralis*. Zvýšená byla i hladina fenolických látek a flavonoidů [72]. Fenolické látky hrají důležitou roli při odstraňování ROS, a také mají chelatační účinky [72]. Vliv mědi byl také sledován v rostlinách papriky. Nárůst aktivity SDH byl zaznamenán u stonkových článků poddélkových (hypokotylů) [73].



Zvýšení aktivity SDH bylo zjištěno také v kořenech ženšenu pravého (*Panax ginseng*) vystavených účinkům kyseliny salicylové [74] a u jahod vystavených nízké teplotě (1 °C) [75]. Vliv nízké teploty byl zkoumán i na rostlinách rajčete, k nejvyššímu nárůstu aktivity SDH došlo u rostlin vystavených teplotám nižším než 13 °C, což je zároveň hraniční teplota pro vznik poškození chladem [76].

## **1.4 Stres rostlin**

Na rostliny neustále působí široká škála stresových faktorů, jak biotické tak abiotické povahy. Mezi nejčastější biotické stresory ohrožující život rostlin patří viry, bakterie, houby, bezobratlí, a dokonce i jiné rostliny [4]. Co se týká abiotických faktorů vyvolávajících stresové podmínky, nejčastější bývají stres suchem, zatopením, zasolením, zvýšenou teplotou i stres chladem [77]. Ale co je to vlastně stres? Stres se obvykle definuje jako externí faktor, který má na rostlinu nepříznivý vliv. Pojem stres velmi úzce souvisí s tolerancí na stres, což je schopnost rostliny vypořádat se s nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí. Dalším významným pojmem je aklimatizace. O rostlině se hovoří, že se aklimatizovala v případě, že k zvýšení tolerance nastalo po předchozím vystavení stresu. Adaptace je naproti tom spojená s geneticky daným stupněm rezistence, který daný druh získal v procesu selekce. Adaptace a aklimatizace na environmentální stres je výsledkem organizace integrovaných dějů vyskytujících se na všech úrovních od anatomické a morfologické úrovně po buněčnou, biochemickou a molekulární [77].

Adaptace na stres hraje významnou roli v rozšíření jednotlivých rostlinných druhů v daných klimatických podmínkách. Vliv stresu se také podepisuje na ztrátách v úrodě. Proto pochopení fyziologických procesů provázejících poranění způsobená stresem a mechanismů adaptace a aklimatizace rostlin na environmentální stres jsou důležité jak pro zemědělství, tak pro životní prostředí [77].

### **1.4.1 Biotický stres**

Rostliny oproti živočichům nemají imunitní systém skládající se ze specializovaných buněk zabezpečujících obranu vůči patogenům. Přisedlý způsob života rostlinám také zabraňuje uniknout jakýmkoliv nepříznivým podmínkám. Rostlinné buňky proto vlastní jak předem danou tak i indukovanou obranyschopnost napomáhající

minimalizovat infekci. Choroba, jakožto důsledek úspěšné infekce rostlinu málokdy usmrtí. Přírozeným výběrem se počet smrtelných rostlinných patogenů omezil, jelikož patogen, který ponechá hostitele naživu, má více času na reprodukci.

Mezi důležité biologické stresové faktory ovlivňující život rostlin patří i rostlinné viry. Existuje více než 40 rodin DNA a RNA rostlinných virů. Virová infekce se u rostlin může projevit žloutnutím listů, nekrózou či vznikem mozaikových vzorů na listech. Rostlinné viry nedisponují žádným mechanismem, který by jim umožnil vstup do rostlinné buňky. Infekce může proběhnout jen přes již existující mechanické poranění nebo prostřednictvím přenašečů jako je hmyz. Proto, aby virová infekce úspěšně proběhla je potřeba, aby se virus replikoval v místě infekce. Dále je nutné rozšíření viru do sousedních buněk a do vzdálenějších částí rostliny pomocí cévního systému. Pro úspěšnou infekce je také nutné potlačit obranné mechanismy hostitele, a tím kolonizovat rostlinu. Virový genom je replikován v cytoplazmě za využití translačních aparátů hostitele. U některých virů může transkripce probíhat i v jádru také s využitím replikačních mechanismů hostitele.

Transport virových částic do sousedních buněk nastává pomocí intracelulárních pohybů přes kanály spojujících jednotlivé buňky-plasmodesmy. Pohyb virových částic je umožněn díky virovým „movement proteinům“, které ve spolupráci s různými komponentami cytoskeletu hostitelské buňky modifikují plasmodesmata, čím usnadní pohyb virové částice do sousední buňky. Existují dvě strategie ulehčení pohybu přes plasmodesmata. První způsob je dočasné zvýšení limitu rozšíření plasmodesmat, čím je umožněn přechod velkých virových částic. Další strategie využívá formaci velké tabulární struktury sestavené z tzv. „movement proteinů“. Tyto struktury rozšiřují plasmodesmata a usnadňují tak průchod virovým částicím.

Mezi okamžité odpovědi rostlin na přítomnost patogenu patří syntéza ROS. ROS jsou syntetizovány také pomocí membránově vázané NADPH-oxidasy. Význam těchto látek v odpovědi na biotický stres spočívá v jejich přímé toxicitě pro patogen. Zároveň se podílejí na zpevnování buněčné stěny. Další okamžitou odpovědí na biotický stres je tzv. hypersenzitivní reakce. Jedná se o usmrcení buněk v místě napadení patogenu, což mu zabrání v přístupu k dalším živinám a omezí tak jeho šíření. Dále dojde v rostlině napadené patogenem k syntéze NO, který slouží jako signální molekula [4,39,78].

### 1.4.2 Solný stres

Rostliny se s vysokou koncentrací solí setkávají zejména v přímořských oblastech. Ve vnitrozemí se ze zasolenou půdou můžeme setkat v případě, že sůl je odplavena do půdy z přírodních geologických ložisek. Velkým problémem je také akumulace soli v zavlažovací vodě. Vypařováním z půdy unikne čistá vodní pára a soli, ve vodě rozpuštěné zůstanou v půdě. V případě, že není možné nahromaděnou sůl odplavit do odtokového systému, její koncentrace může dosáhnout hodnot způsobujících stres plodinám citlivým vůči soli jako je např. kukuřice. Přítomnost sodných iontů v půdě může způsobit nejen přímá zranění rostlinám, ale také navodit změnu struktury půdy snížením poréznosti a propustnosti pro vodu [77].

Solný stres představuje pro rostlinu přinejmenším dva typy stresu: jednak osmotický stres způsobený snížením vodního potenciálu a sníženou dostupností vody, jednak stres způsobený akumulací toxické koncentraci iontů [79]. Rostliny se podle své citlivosti vůči soli rozdělují do dvou skupin, a to na halofyty a glykofyty. Halofyty se přirozeně vyskytují v prostředí s vysokou koncentrací soli, vyvinuly si strategie, jak v takových podmínkách prospívat, kdežto glykofyty jsou na přítomnost soli v půdě daleko citlivější. Halofyté většinou mohou po zasolení ve svých tkáních akumulovat vyšší koncentrace iontů, zatímco glykofyté nikoliv. U nich dochází především k vylučování iontů, avšak existují i výjimky [79]. Obecně rostliny k udržení nízké koncentrace  $\text{Na}^+$  iontů v cytosolu využívají membránově vázané transportéry, které řídí vylučování  $\text{Na}^+$  iontů, nebo jejich oddělování do extracelulárního prostoru, či vakuoly. Bylo popsáno několik přenašečových systémů interagujících s  $\text{Na}^+$  ionty, včetně primárního buněčného proteinu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporteru plasmatické membrány. Podobné  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportery se nacházejí také na membráně vakuoly (tonoplastu), kde přispívají k udržování buněčné rovnováhy. Další důležitou determinantou tolerance zasolení je rodina vysoko-afinitních draselných transportérových proteinů (HKT). Předpokládá se, že HKT se podílejí na vykládání  $\text{Na}^+$  iontů z xylému (phloem unloading), a tím regulují množství a akumulaci  $\text{Na}^+$  iontů v nadzemních částech rostliny [80]. Stresových odpovědí se účastní také neselektivní kationtové kanály, katalyzující pasivní tok kationtů rostlinnými membránami [81].

Přítomnost sodných iontů v oblasti růstu kořenů ovlivňuje celkový příjem vody rostliny a to tím, že snižuje vodní potenciál v půdě. Rostliny jsou tak nuceny vytvářet ještě nižší vodní potenciál v listech, aby zachovaly klesající gradient vodního potenciálu mezi

půdou a listy. Některé rostliny jsou schopny se osmoticky přizpůsobit růstu ve slaných půdách. Těmito změnami předejdou snížení turgoru, ale přizpůsobení má za následek pomalejší růst buněk. Při nebezpečných koncentracích soli v půdě se také projevují toxické účinky způsobené akumulací iontů v rostlinných buňkách. Sodné ionty mohou u některých rostlin způsobit vytěsnění vápenatých iontů z plazmatické membrány, což má za důsledek změnu v její permeabilitě. Akumulace vysokých koncentrací sodných iontů a chloridových anionů v chloroplastech inhibuje fotosyntézu. Inhibice fotosyntézy může mít vliv na metabolismus uhlíku a fotofosforylaci. Jak už bylo zmíněno, důležitou strategií vyrovnání se s vysokou koncentrací soli je vyloučení soli z meristémů, zejména z fotosynteticky aktivních částí-výhonků a z listů. Sodné ionty vstupují do kořenů pasivně, takže na jejich odstranění je nutná spotřeba energie. Některé rezistentní rostliny nevyklučují ionty solí kořeny, namísto toho mají na povrchu listů žlázy, do kterých jsou ionty transportovány. Zde dochází ke krystalizaci soli, a tím už není škodlivá. Aby se některé rostliny vyrovnaly s nedostatkem vody, které při zasolení půdy vzniká, jsou nuceny osmoticky se přizpůsobit. Ke snížení vodního potenciálu v rostlině mohou přispět dva intracelulární procesy. Prvním je akumulace iontů ve vakuole, kde ionty mohou přispět k osmotickému potenciálu buněk, aniž by poškodily enzymy citlivé na sůl. Druhým procesem přispívajícím k úpravě osmotického potenciálu buněk je syntéza osmoticky aktivních látek v cytosolu. Mezi ně patří např. prolin, sorbitol, mannitol, pinitol a sacharosa. Tato schopnost rostlin v přírodě není důležitá pro přežití, ale v zemědělství může ovlivnit růst plodin a jejich úrodu [77].

### 1.4.3 Teplotní stres

Různé typy rostlinných pletiv jsou schopny čelit různě vysokým teplotám. Většina rostlinných tkání není schopná přežít dlouhé vystavení teplot nad 45°C. Zatímco semena snášejí teploty i okolo 120°C a pyl některých rostlin i 70°C teploty. Opakované krátkodobé vystavení nebezpečně vysokým teplotám může indukovat toleranci na vyšší teploty, které jsou jinak pro rostlinu smrtelné. Tento jev se nazývá indukovaná tolerance. Teplotní stres je úzce spjatý se stresem vodním. Většina C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostlin s přístupem k dostatečnému množství vody si chlazení zabezpečuje prostřednictvím vypařování. V případě, že vody je nedostatek, intenzita chlazení se sníží a roste teplota tkání. CAM rostliny nechávají přes den své průduchy uzavřené, takže se nemohou ochlazovat transpirací. Místo toho rozptylují dopadající slunečné záření zpětným vyzářením infračerveného záření [77].

Vysoká teplota inhibuje fotosyntézu i respiraci. S rostoucí teplotou však činnost fotosyntézy klesá rychleji než činnost respirace. Teplota, při které se množství fotosyntézou fixovaného CO<sub>2</sub> rovná množství CO<sub>2</sub> uvolněného respirací se nazývá bod tepelné kompenzace. Když teplota stoupne nad tento bod, fotosyntéza není schopná nahradit CO<sub>2</sub>, který je uvolněn respirací. Tato nerovnováha je jednou z hlavních příčin škodlivých účinků vysoké teploty na rostliny. Zvýšená teplota ovlivňuje také buněčné membrány. Zvýšená tekutost membránových lipidů v podmínkách s vyšší teplotou koreluje se ztrátou fyziologické funkce. Při vyšších teplotách je snížena síla vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí mezi polárními skupinami proteinů nacházejících se ve vodní fázi membrán. Narušení membrán je také příčinou inhibice fotosyntézy a respirace, které jsou závislé na aktivitě membránově vázaných enzymů a elektronových přenašečů [77].

Při zvýšení teploty o 5 až 10 °C dochází u rostlin k produkci unikátní sady proteinů, známých jako heat-shock proteiny (HSP). Tyto proteiny jsou přítomné ve všech buňkách, jak prokaryotických, tak eukaryotických. Jejich úlohou je napomoci buňkám vyrovnat se ze stresem. HSP slouží jako chaperony při skládání proteinů, aby důsledkem zvýšené teploty nedošlo k jejich nesprávnému složení, čímž by ztratily svou funkci. Vysoká teplota je stres nejčastěji vedoucí ke špatně složeným proteinům. HSP také napomáhají translokaci proteinů do cílových organel či předcházejí nežádoucím interakcím proteinů a jejich agregaci či odstraňují špatně sbalené proteiny. HSP mají důležitou funkci při regeneraci rostlin z působení stresu, kdy se podílejí na opravách (tzv. refolding) či degradaci poškozených proteinů [77,82].

HSP se na základě své velikosti původně dělily do šesti tříd, a to na HSP 40, HSP 60, HSP 70, HSP 90, HSP 100 a smHSP (15-30 kDa), nyní se dělí na základě svojí homologie. HSP jsou kódovány velkými genovými rodinami, např. *Arabidopsis thaliana* obsahuje 18 genů kódujících HSP 70 [83]. Jednotlivé HSP 70 jsou pak lokalizovány do cytoplasmy, ENR, plastidů a do mitochondrie. Některé proteiny HSP 70 jsou exprimovány konstitutivně, ty se někdy označují Hsc 70 (heat shock cognate), ostatní proteiny se exprimují teprve po vystavení stresu [83].

Buňky, které byly indukovány k syntéze HSP, vykazovaly zvýšení teplotní tolerance a byly schopny přežít i teploty, které by pro ně byly jinak smrtelné. HSP nesouvisí výhradně se stresem způsobeným vysokou teplotou. Mohou být indukovány i celou řadou různých enviromentálních stresů jako je chlad, sucho, zasolení a další. Díky

tomu buňky, vystavené jednomu typu stresu mohou zároveň získat obranu vůči dalšímu typu stresu [77].

## 2 Cíl Práce

1. Zjistit, zda se NADP-dependentní enzymy (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH, SDH) a produkce NADPH podílejí na obranné odpovědi rostlin tabáku vůči biotickému stresu způsobeného virovou infekcí *Y virem bramboru*, kmenem NTN.
2. Sledovat, jakým způsobem změny vystavení rostlin teplotnímu šoku průběh virové infekce a aktivitu sledovaných enzymů.
3. Zjistit, zda také abiotický stres v podobě vysoké koncentrace soli bude mít vliv na studované enzymy.

## 3 Metody

### 3.1 Materiál

Rostlinný materiál–rostliny tabáku (*Nicotina tabacum* L., cv. Petit Havana SR1)

Infekční materiál–rostliny infikované *Y virem bramboru* kmenem NTN laskavě poskytnuty doc. Čerovskou (Ústav experimentální botaniky AV ČR)

Protilátky – monoklonální králičí protilátky třídy Ig G připravené proti PVY<sup>NTN</sup> (2 mg/ml) laskavě poskytnuty doc. Čerovskou (Ústav experimentální botaniky AV ČR)

- polyklonální protilátky připravené proti králičím protilátkám konjugované s alkalickou fosfátasou, Sigma, USA
- polyklonální králičí protilátky připravené proti HSP 70, Thermoscientific, Německo

### 3.2 Použité chemikálie

2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma, USA

Akrylamid – Sigma, USA

Bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/Nitroblue tetrazolium chlorid tablety, Sigma, USA

Bradfordovo činidlo, Sigma, USA

BSA, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R, G , Sigma, USA

DTT, Sigma, USA

EDTA, Lachema, ČR

D-Glukosa-6-fosfát sodný, Sigma, USA

D, L-Isocitrát trisodný, Sigma, USA

D-frukosa-1,6-bisfosfát, Sigma, USA

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, Sigma, USA

Glycerol, Penta, ČR

Glycin, Sigma, USA

Jodonitrotetrazolum chlorid, Sigma, USA

L-malát sodný, Sigma, USA

MgCl<sub>2</sub>, Sigma, USA

NADP<sup>+</sup>, Sigma, USA

NADPH, Sigma, USA



Nitroblue tetrazolium chlorid, Sigma, USA  
Fenazinmethosulfát , Sigma, USA  
PVP, Sigma, USA  
SDS, Serva Německo  
Sacharosa, Lachema, ČR  
Šikimát sodný, Sigma, USA  
Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma, USA  
TEMED, Serva, Německo  
Tween, Sigma, USA

### **3.3 Použité přístroje**

Analytické váhy XE Series 100A, Denver Instrument Company, USA  
Centrifuga UNIVERSAL 32R, Hettich Zentrifugen, Německo  
Elektroforetická souprava, Biometra, Německo  
Mísic gradientu, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie  
pH metr UB-10, Denver Instrument Company, USA  
Spektrofotometr Helios  $\alpha$ , Thermo Spectronic, USA  
Spektrofotometr Ultrospec 2 100, Amersham Pharmacia Biotech, Anglie  
Spektrofotometr AAS 3 Weiss Jean, Německo  
Souprava pro přenos proteinů z gelu na membránu, Biometra, Německo  
Vortex v-1 plus, Biosan, Lotyšsko

### **3.4 Pěstování experimentálních rostlin a provedení jednotlivých pokusů**

#### **3.4.1 Experimentální rostliny pro studium vlivu PVY<sup>NTN</sup>**

V této práci byly použity rostliny tabáku (*Nicotina tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) pěstované ve směsi půdy a písku (3:1), při teplotě 20 °C ve skleníku s přirozeným osvětlením. Po měsíci od vysetí byly rostliny rozsazeny do samostatných 0,3 l nádob směsi zeminy a písku. O tři týdny později byla část pokusných rostlin (30 rostlin) infikována *Y virem bramboru*, kmenem NTN. Infekce byla provedena následovně: z rostlinného materiálu infikovaného PVY<sup>NTN</sup> byl připraven extrakt v desetinasobku 0,057 M fosfátovém pufru, pH 8,0. Extrakt byl nanesen na spodní list každé rostliny, který byl před tím poškrábáný karborundovým práškem. Mechanické poškození listu je nezbytné pro vniknutí viru do rostliny. Další skupina rostlin infikována nebyla, ta představovala rostliny

kontrolní (30 rostlin). Vzorky byly odebírány v intervalu 3 až 4 dny po inokulaci, jak z infikovaných, tak kontrolních rostlin. Vždy byly odebírány horní listy několika rostlin, které byly nastříhány na kousky a z nich byly vytvořeny směsné vzorky. Vzorky byly zváženy, zmrazeny v tekutém dusíku a následně uchovány při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pokus byl 3-krát opakován.

### **3.4.2 Experimentální rostliny pro studium společného vlivu teplotního šoku a virové infekce**

Rostliny pro studium společného vlivu teplotního šoku a virové infekce byly pěstovány, očkovány a odebírány dle předchozího postupu 3.4.1. Jednalo se o pět skupin rostlin, každá skupina obsahovala 15 rostlin. První skupinu tvořily rostliny kontrolní, které nebyly infikovány ani vystaveny teplotnímu šoku, druhou skupinu představovaly rostliny pouze infikované virem PVY<sup>NTN</sup>, třetí skupina obsahovala rostliny vystavené teplotnímu šoku, ale neinfikované, čtvrtá skupina obsahovala rostliny nejprve infikované virem PVY<sup>NTN</sup> a poté vystavené teplotnímu šoku a v poslední skupině byly rostliny nejprve vystavené teplotnímu šoku a poté infikované. Teplotní šok byl proveden vystavením rostlin teplotě  $40^{\circ}\text{C}$  v osvětleném boxu po dobu 120 min.

### **3.4.3 Experimentální rostliny pro studium vlivu NaCl**

Na tento pokus byly použity rovněž rostliny tabáku (*Nicotina tabacum* L., cv. Petit Havana SR1). Měsíc staré rostliny byly jednotlivě rozsazeny do směsi zeminy a písku a pěstovány při  $20^{\circ}\text{C}$  a při přirozeném osvětlení. Po pěti týdnech byly rostliny vyjmuty z půdy, kořeny byly očištěny vodou a rostliny byly přeneseny buď do destilované vody, (ty sloužily jako rostliny kontrolní), nebo do 100 mM roztoku NaCl (skupina stresovaných rostlin). Kontrolní skupina i skupina vystavená stresu obsahovala 5 rostlin. Směsné vzorky listů byly odebírány v jednodenních nebo dvoudenních intervalech. Rostliny byly vystaveny stresu po dobu jednoho týdne. Odebrané vzorky byly ihned zpracovány. Pokus byl 3-krát opakován.

## **3.5 Stanovení enzymové aktivity**

Redukovaná (NADPH) a oxidovaná forma ( $\text{NADP}^{+}$ ), které slouží jako koenzym NADP-dependentních enzymů, mají odlišné absorpční spektrum. Díky tomu, že redukovaná forma (NADPH) má na rozdíl od oxidované absorpční maximum při 340 nm, je možné spektrofotometricky sledovat úbytek či přírůstek tohoto koenzymu a stanovit tak

aktivitu příslušného NADP-dependentního enzymu [84]. Vzhledem k tomu, že pro kinetická stanovení enzymové aktivity všech sledovaných enzymů (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH, SHD a NP-GPD) byl jako substrát použit  $\text{NADP}^+$ , byl spektrofotometricky sledován nárůst absorbance při 340 nm odpovídající množství vznikajícího NADPH. Reakce probíhala po dobu 5 minut 50 s a aktivita byla vypočítána podle vzorce:

$$a = \frac{\Delta A \cdot V_t \cdot 1000}{\epsilon \cdot t \cdot l \cdot V_e} \quad (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1})$$

kde  $\Delta A$  odpovídá změně absorbance při 340 nm po dobu 5 min 50 s

$\epsilon$ ...molární absorpční koeficient NADP(H)  $6200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$

$l$ ...délka kyvety, 1 cm

$t$ ...5,83 min

$V_t$ ...celkový objem reakční směsi v kyvetě

$V_e$ ...objem enzymového preparátu v kyvetě

V experimentech je aktivita vztažena na 1 gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

### 3.5.1 Příprava vzorků pro stanovení enzymové aktivity

Vzorek listů rostlin byl homogenizován s extrakčním pufru ve třecí misce. Na 1 g rostlinného vzorku byly použity 3 ml extrakčního pufru obsahujícího 100 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA a 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . K extraktům bylo přidáno asi 0,02 g PVP na 1 ml extraktu. Poté byly extrakty centrifugovány 15 min při  $16\,600 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Po ukončení centrifugace byl supernatant odebrán pipetou a použit ke stanovení enzymové aktivity. Každý odběrový den byly k měření aktivity NADP-dependentních enzymů použity 3 kontrolní a 3 infikované směsné vzorky. Pro měření aktivity studovaných enzymů v solném pokusu byl použitý jeden vzorek ze stresované a kontrolní rostliny.

### 3.5.2 Stanovení enzymové aktivity NADP-ME

Aktivita NADP-ME byla stanovena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufru pH 7,6; 10 mM L- malát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Reakce byla spuštěna přidáním 50  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu.

### **3.5.3 Stanovení enzymové aktivity NADP-ICDH**

Aktivita NADP-ICDH stanovena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 2 mM D, L-isocitrát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Reakce byla spuštěna přidáním 100  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu.

### **3.5.4 Stanovení enzymové aktivity G6PDH**

Aktivita G6PDH byla stanovena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 5 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Reakce byla spuštěna přidáním 100  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu.

### **3.5.5 Stanovení enzymové aktivity SDH**

Aktivita SDH byla stanovena v 1 ml reakční směsi, která obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru pH 9; 3 mM šikimát; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Reakce byla iniciována přidáním 100  $\mu\text{l}$  rostlinného extraktu.

### **3.5.6 Stanovení enzymové aktivity NP-GPD**

Aktivita NP-GPD byla stanovena v 1 ml reakční směsi spřaženou reakci, která obsahovala 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru pH 9; 10 mM fruktosa-1,6 -bisfosfát; 1 U aldolasy; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ ; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Aldolasa byl ponechán reagovat 60 minut, a až poté byl přidán rostlinný extrakt (50  $\mu\text{l}$ ), kterým byla reakce NP-GPD iniciována.

Ve všech vzorcích byly současně měřeny i slepé pokusy stejným postupem uvedeným výše, s tím rozdílem, že reakční směsi neobsahovaly substrát pro jednotlivé enzymy (L-malát, D,L- isocitrát, D-glukosa-6-fosfát, nebo šikimát,) Pro měření aktivity NP-GPD slepý vzorek neobsahoval aldolasu. Případně byly výsledky měření vzorků o hodnotu zjištěnou v těchto slepých pokusech redukovány.

## **3.6 Elektroforetické metody**

### **3.6.1 Elektroforetická separace v denaturujícím prostředí SDS**

#### **3.6.1.1 Příprava vzorku pro SDS elektroforézu**

Jako vzorky byly pro elektroforetickou separaci v prostředí SDS použity rostlinné extrakty zpracovány výše uvedeným postupem (kapitola 3.4.3). K daným extraktům byl

přidán vzorkový pufr v poměru 1:1. Složení vzorkového pufru bylo: 0,005 % bromfenolová modř, 100 mM DTT, 70 mM SDS, 20 % glycerol, 0,13 M Tris-HCl pufr pH 6,8. Směs vzorkového pufru s rostlinným extraktem byla před aplikací do gelu 10 min vařena ve vodní lázni při 100 °C.

### **3.6.1.2 Provedení SDS elektroforézy**

Elektroforetická separace rostlinných vzorků byla provedena ve 12 % separačním polyakrylamidovém gelu a 5 % zaostřovacím gelu.

12% separační gel obsahoval 3 ml 30% akrylamidu; 1.9 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,003 ml TEMED; 0,075 ml 10 % SDS; 2,45 ml destilované vody a 0.075 ml 10% peroxodisíanu amonného.

5 % zaostřovací gel obsahoval 0,335 ml 30% akrylamidu; 0,25 ml 1,5 mM Tris-HCl pufr pH 6,8; 0,002 ml TEMED; 0,02 ml 10% SDS; 1,350 ml destilované vody a 0,02 ml 10 % peroxodisíanu amonného.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris a 1 g SDS v 1 l destilované vody. Napětí před dosažením separačního gelu bylo 70 V, po dosažení bylo zvýšeno na 140 V [85].

### **3.6.1.3 Detekce bílkovin po SDS elektroforéze**

Po skončení elektroforetické separace byl polyakrylamidový gel vložen do barvicí lázně, ve které byl ponechán přes noc. Lázeň obsahovala 1 g Coomassie Brilliant Blue R250, 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G, 212,5 ml ethanolu, 25 ml methanolu, 50 ml kyseliny octové a 212,5 ml destilované vody.

Po obarvení byl gel následně vložen do odbarvovacího roztoku, který obsahoval 650 ml destilované vody, 250 ml ethanolu a 100 ml kyseliny octové.

## **3.6.2 Elektroforetická separace v nativním prostředí**

### **3.6.2.1 Příprava vzorku pro nativní elektroforézu**

Pro elektroforetickou separaci v nativním prostředí byly připraveny rostlinné extrakty dle postupu 3.4.3 .K těmto extraktům byla přidána sacharosa (20 %).

Elektroforetická separace příslušných vzorků v nativním prostředí byla provedena v gradientu 6 - 12% separačního polyakrylamidovém gelu a v 3% zaostřovacím gelu.

12% separační polyakrylamidový gel obsahoval 3 ml 30% akrylamidu; 1,9 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,003 ml TEMED; 0,075 ml 10% glycerolu; 2,45 ml destilované vody a 0,075 ml 10% peroxodisíanu amonného;.

6% separační polyakrylamidový gel obsahoval 1,5 ml 30% akrylamidu, 1,9 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,006 ml TEMED; 0,075 ml 10% glycerolu; 3,95 ml destilované vody a 0,075 ml 10 % peroxodisíanu amonného;.

3% zaostřovací polyakrylamidový gel obsahoval 0,2 ml 30% akrylamidu; 0,25 ml 1,5 mM Tris-HCl pufru pH 8,8; 0,004 ml TEMED; 0,02 ml 10% glycerolu; 1,5 ml destilované vody a 0,02 ml 10 % peroxodisíanu amonného;.

Elektrodový pufr obsahoval 18,8 g glycinu, 3 g Tris a 10 ml 10% glycerolu v 1 l destilované vody. Napětí před dosažením separačního gelu bylo 70 V, po dosažení bylo zvýšeno na 140 V [86].

#### **3.6.2.2 Detekce NADP-ME po nativní elektroforéze**

Po skončení nativní elektroforetické separace byl gel vložen do 10 ml reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pufru pH 7,6; 10 mM L- malát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Směs obsahovala také 0,1 mg/ml nitroblue teteazolium a 5  $\mu\text{g/ml}$  fenazin methosulfát [87].

#### **3.6.2.3 Detekce NADP-ICDH po nativní elektroforéze**

Po skončení elektroforetické separace byl gel vložen do 10 ml reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 2 mM D, L-isocitrát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$  a 0,1 mg/ml nitroblue teteazolium a 5  $\mu\text{g/ml}$  fenazin methosulfát [87].

#### **3.6.2.4 Detekce G6PDH po nativní elektroforéze**

Po skončení elektroforetické separace byl gel vložen do 10 ml reakční směsi obsahující 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 5 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$  a 0,1 mg/ml nitroblue teteazolium a 5  $\mu\text{g/ml}$  fenazin methosulfát [87].

#### **3.6.2.5 Detekce SDH po nativní elektroforéze**

Po elektroforetické separaci byl gel vložen do 10 ml reakční směsi. Obsahující 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru pH 9; 3 mM šikimát; 0,2 mM  $\text{NADP}^+$ . Směs obsahovala také 0,1 mg/ml nitroblue teteazolium a fenazin methosulfát [87].

## 3.7 Imunochemické metody

### 3.7.1 ELISA

Pro relativní stanovení obsahu PVY<sup>NTN</sup> viru v rostlinných vzorcích byla použita metoda ELISA (z angl. Enzyme linked immuno sorbent assay) [88]. Tato metoda spočívá v navázání specifické primární protilátky zaměřené proti PVY<sup>NTN</sup> na antigen obsažený v infikovaném materiálu (obalový protein virové částice) a následném navázání specifické sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase na komplex primární protilátky s antigenem. Po přidání substrátu alkalické fosfatasy p-nitrofenolfosfátu je spektrofotometricky měřena absorbance vzniklého p-nitrofenolu při vlnové délce 405 nm.

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce s desetinásobkem potahovacího pufru. Potahovací pufr o pH 9,6 obsahoval 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 35 mM NaHCO<sub>3</sub> a 3 mM NaN<sub>3</sub>. Po homogenizaci byly vzorky přefiltrovány přes gázu. Do každé jamky bylo naneseno 100 µl vzorku a takto byly mikrotitrační destičky ponechány přes noc při teplotě 4 °C, aby došlo k navázání virových částic na povrch destičky.

Po navázání virových částic byla destička 4x promyta 200 µl promývacího pufru. Promývací pufr obsahoval PBS pufr (pH 7,4; 137 mM NaCl; 8 mM NaHPO<sub>4</sub>; 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 3 mM NaN<sub>3</sub>) s detergentem 0,05% Tween 20.

Po promytí bylo do každé jamky naneseno 100 µl králičí protilátky proti PVY<sup>NTN</sup> o koncentraci 1 µg/l. Protilátka byla ředěna v konjugačním pufru, který měl pH 7,4 a obsahoval 2% polyvinylpolypyrrolidonu a 0,2% ovalbuminu v PBS pufru s 0,05 % Tweenu 20. Protilátka byla inkubována 2 hodiny v inkubátoru při 37 °C.

Po skončení inkubace byla mikrotitrační destička opět 4x promyta promývacím pufrem. Do každé jamky bylo naneseno 100 µl sekundární kozí protilátky proti králičí protilátce. Tato protilátka byla ředěna v poměru 1: 1000 v konjugačním pufru. Destička byla opět ponechána inkubovat v inkubátoru po dobu 3 h při teplotě 37 °C.

Po inkubaci byla destička 4x promyta promývacím pufrem a do každé jamky bylo přidáno 100 µl substrátu pro alkalickou fosfatase. Tím byl p-nitrofenylfosfátu rozpuštěný v substrátovém pufru (1mg/ml). Substrátový pufr obsahoval 1,4 ml 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>; 1,1 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10 µl 0,1 M MgCl<sub>2</sub> a 7,5 ml H<sub>2</sub>O. Destička s naneseným substrátem byla ponechána v inkubátoru 3 h. V jamkách, ve kterých byl přítomen virus PVY<sup>NTN</sup> došlo

k vytvoření žlutého p-nitrofenolu, jehož intenzita byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm pomocí čtečky destiček.

### **3.7.2 Imunochemická detekce proteinu HSP 70 na nitrocelulosové membráně**

#### **3.7.2.1 Přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu**

Vzorky rozdělené SDS-elektroforetickou separací v denaturujícím prostředí (viz. kapitola 3.6.1.) byly z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu metodou přenosu proteinů („western blot“) a na membráně byla imunochemicky detekována přítomnost HSP 70 pomocí specifické protilátky.

Přenos proteinů byl proveden tak, že do soupravy pro přenos proteinů Biometra se na 5 vrstev filtračního papíru a na nitrocelulosovou membránu umístil gel po SDS elektroforéze, přičemž filtrační papíry, membrána i gel byly předtím krátce ponořeny do transferového pufru. Transferový pufre obsahoval 10% methanol; 25 mM Tris-HCl; 150 mM glycin; pH 8,3. Na gel se rovněž umístilo 5 vrstev filtračního papíru napuštěného transferovým pufrem. Po stlačení všech vrstev se na soupravu nasadil kryt a nechal se 30 až 35 min probíhat proud vypočítaný z obsahu membrány (proud v mA by měl odpovídat pětinásobku obsahu membrány v cm<sup>2</sup>).

#### **3.7.2.2 Detekce přítomnosti HSP 70 specifickou protilátkou na nitrocelulosové membráně**

Po skončení přenosu proteinů na membránu je nutné na membráně blokovat další vazná místa nacházející se na jejím povrchu. To bylo dosaženo ponořením membrány na hodinu do 1% roztoku BSA (0,1 g BSA v 10 ml PBS pufru jehož složení je popsáno v oddílu 3.7.1).

Po blokování byla membrána třikrát ponořena do promývacího pufru (vid 3.7.1) na 5 min. Poté byla membrána inkubována s roztokem králičí protilátky proti HSP 70, která byla ředěna v poměru 1:1000 v konjugačním pufru. přes noc při 37 °C. Po navázání protilátky byla membrána opět třikrát promyta v promývacím pufru a inkubována se sekundární kozí protilátkou značenou alkalickou fosfataseou zaměřenou proti králičí protilátce ředěnou konjugačním pufrem 1:1000 po dobu tří hodin při 37 °C. Po inkubaci



byla membrána promyta a ponechána v 10ml roztoku barvicí tablety BCIP/NBT (0,17 mg BCIP, 0,33 mg NBT) kde dojde k zabarvení míst s navázanou kozí protilátkou.

### **3.8 Stanovení koncentrace sodných iontů**

#### **3.8.1 Příprava vzorku pro stanovení sodných iontů**

Listy tabáku stresovaných i kontrolních rostlin byly homogenizovány v destilované vodě. Na 1 g rostlinného vzorku byly použity 3 ml destilované vody. Poté byly extrakty centrifugovány 15 min při  $16\,600 \times g$  a  $4\,^{\circ}\text{C}$ . Po centrifugaci byl odebrán supernatant a skladován při  $-25\,^{\circ}\text{C}$ . Před vlastním měřením byly vzorky 50 000x ředěny v destilované vodě. Byly připraveny dvě sady vzorků. Jedna obsahovala jenom ředěný vzorek, další obsahovala ředěný vzorek s přídavkem 50  $\mu\text{l}$  standardního roztoku NaCl o koncentraci 1000  $\mu\text{l/l}$ .

#### **3.8.2 Vlastní stanovení sodných iontů**

Koncentrace sodných iontů v extraktech solí stresovaných rostlin tabáku a kontrolních rostlinách byla stanovena metodou atomové emisní spektrometrie (AAS) spektrofotometrem AES 3 (Weiss Jean, Německo). Atomová emisní spektrometrie je optická metoda založená na měření emise elektromagnetického záření [89]. Měření bylo provedeno metodou standardního přídavku, což znamená, že byl změřen daný vzorek nejprve samostatně a poté s přídavkem známé koncentrace sodných iontů. Výhodou tohoto postupu je využití stejné matrice, čím se zmírní rušení. Měření byla opakována třikrát.

### **3.9 Stanovení množství NADP<sup>+</sup> v rostlinných extraktech**

#### **3.9.1 Příprava vzorku pro stanovení množství NADP<sup>+</sup>**

Rostlinné extrakty byly připraveny ze zmražených vzorků listů kontrolních a PVY<sup>NTN</sup> infikovaných rostlin. Rostlinný materiál byl homogenizován v 1 M HCl, neboť NADP<sup>+</sup> je stabilní v kyselém prostředí. Na 1 g rostlinného materiálu byly použity 3 ml 1 M HCl. Získaný extrakt byl zahřán na  $100\,^{\circ}\text{C}$  po dobu tří minut. Po zchladnutí byl centrifugován 15 min při  $15\,000 \times g$  a  $4\,^{\circ}\text{C}$  s přídavkem PVP. Poté byl rostlinný extrakt neutralizován přídavkem kapky 5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### 3.9.2 Postup stanovení množství NADP<sup>+</sup>

Množství NADP<sup>+</sup> bylo stanoveno v inaktivovaných rostlinných extraktech z infikovaných a kontrolních rostlin tabáku spektrofotometricky při 500 nm enzymatickou metodou. Reakční směs pro stanovení NADP<sup>+</sup> v 1 ml obsahovala 1 U komerčního enzymu redukujícího NADP<sup>+</sup> (G6PDH z *Leconostoc mesenteroides*, Sigma, USA), glukosa-6-fosfát a 100 µl inaktivovaného rostlinného extraktu obsahujícího NADP<sup>+</sup>. Po 30 minutách byla přidána barva, která reaguje s vytvořeným NADPH za vzniku červeného zabarvení. Následně se spektrofotometricky stanovovala absorbance daného vzorku oproti slepému vzorku neobsahujícímu komerční G6PDH [1].

Reakční směs obsahovala 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,4; 5 mM D-glukosa-6-fosfát; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, 200 µl barvy (směs 5 mg/ml jodonitrotetazoliové violeti s 5 µg/ml fenazinmetosulfatem), 220 µl destilované vody. Slepý vzorek se ve svém obsahu lišil jen o absenci glukosa-6-fosfátdehydrogenasy, která byla nahrazena destilovanou vodou.

### 3.9.3 Stanovení množství proteinů

Množství rozpustných proteinů v rostlinných extraktech bylo stanoveno metodou podle Bradfordové [90]. Principem této metody je posun absorpčního maxima činidla Coomassie Briliante Blue G 250 ze 465 nm na 595 nm, který nastane po vzniku komplexu tohoto barviva s bílkovinami. Směs pro stanovení proteinů obsahovala 33,3 µl rostlinného extraktu a 1 ml Bradfordové činidla. Směs byla promíchána a inkubována 20 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance oproti slepému vzorku při vlnové délce 595 nm. Slepý vzorek obsahoval místo rostlinného extraktu 33,3 µl destilované vody. Obsah proteinů byl stanoven odečtením z kalibrační přímky. Ta byla vytvořena použitím standardního proteinu BSA o koncentraci 0 až 1,4 mg/ml.

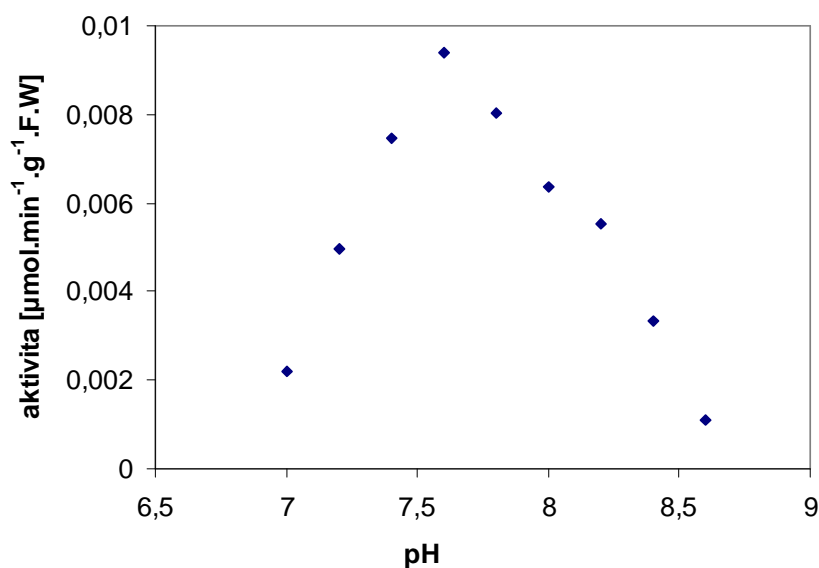
## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení pH optima studovaných enzymů

U sledovaných enzymů (NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH a SDH) tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) byly nejprve optimalizovány metody stanovení aktivity jednotlivých enzymů. U těchto enzymů bylo stanoveno pH optimum.

#### 4.1.1 Stanovení pH optima NADP-ME

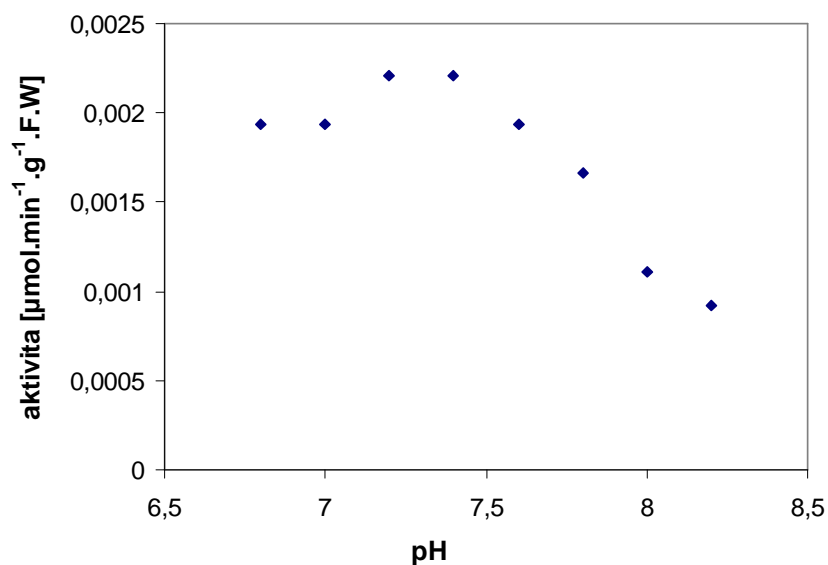
Obrázek č. 11 znázorňuje závislost aktivity enzymu NADP-ME na pH. Optimální hodnota pH byla určena na pH 7,6. Stanovení bylo provedeno v systému 100 mM Tris-HCl pufrů s pH rozmezím od 6,8 až 8,6.



**Obr. č. 11:** Stanovení pH optima enzymu NADP-ME v 100 mM Tris-HCl pufru v rozmezí pH 6,8 – 8,6.

#### 4.1.2 Stanovení pH optima NADP-ICDH

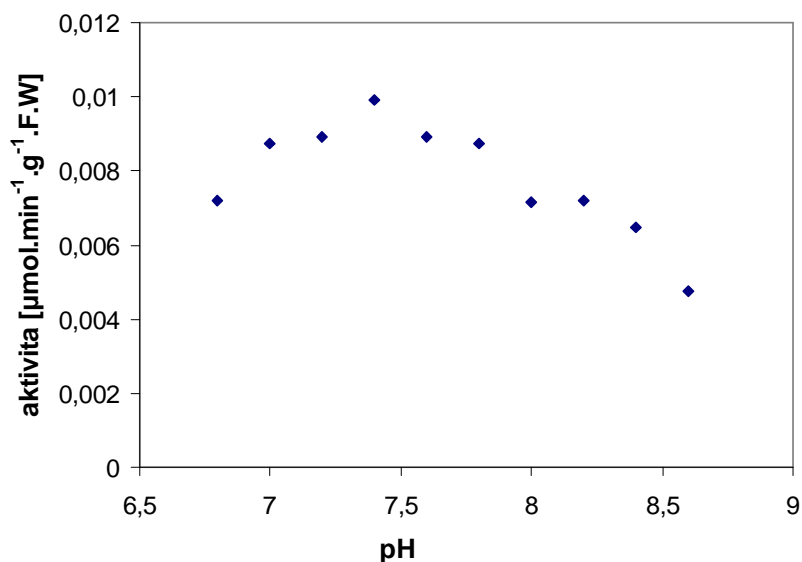
Byla určována závislost aktivity enzymu NADP-ICDH na pH. Optimální hodnota pH byla stanovena na pH 7,4 (obr. č. 12 str. 40). Stanovení bylo provedeno v systému 100 mM Tris-HCl pufrů s pH rozmezím od 6,8 po 8,6.



**Obr. č. 12:** Stanovení pH optima enzymu NADP-ICDH v 100 mM Tris-HCl pufru v rozmezí pH 6,8 – 8,6.

#### 4.1.3 Stanovení pH optima G6PDH

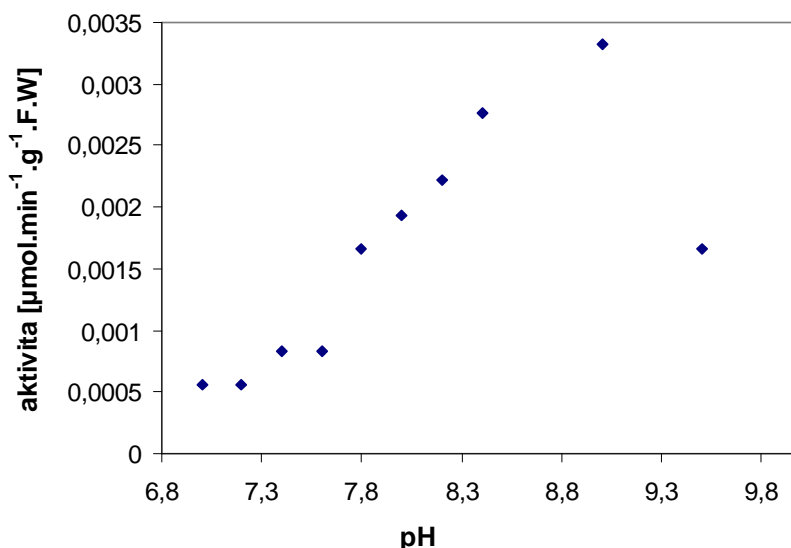
Závislost aktivity enzymu G6PDH na pH je znázorněna na obr. č. 13. Optimální hodnota pH byla určena na pH 7,4. Stanovení bylo provedeno v systému 100 mM Tris-HCl pufrů s pH rozmezím od 6,8 po 8,6.



**Obr. č. 13:** Stanovení pH optima enzymu G6PDH v 100 mM Tris-HCl pufru v rozmezí pH 6,8 - 8,6.

#### 4.1.4 Stanovení pH optima SDH

Na obrázku č. 14 je znázorněna závislost aktivity enzymu SDH na pH. Optimální hodnota pH pro SDH byla stanovena na pH 7,6. Stanovení bylo provedeno v systému 100 mM Tris-HCl pufrů s pH rozmezím od 6,8 po 8,4 a 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru v rozmezí pH 9-9.5.



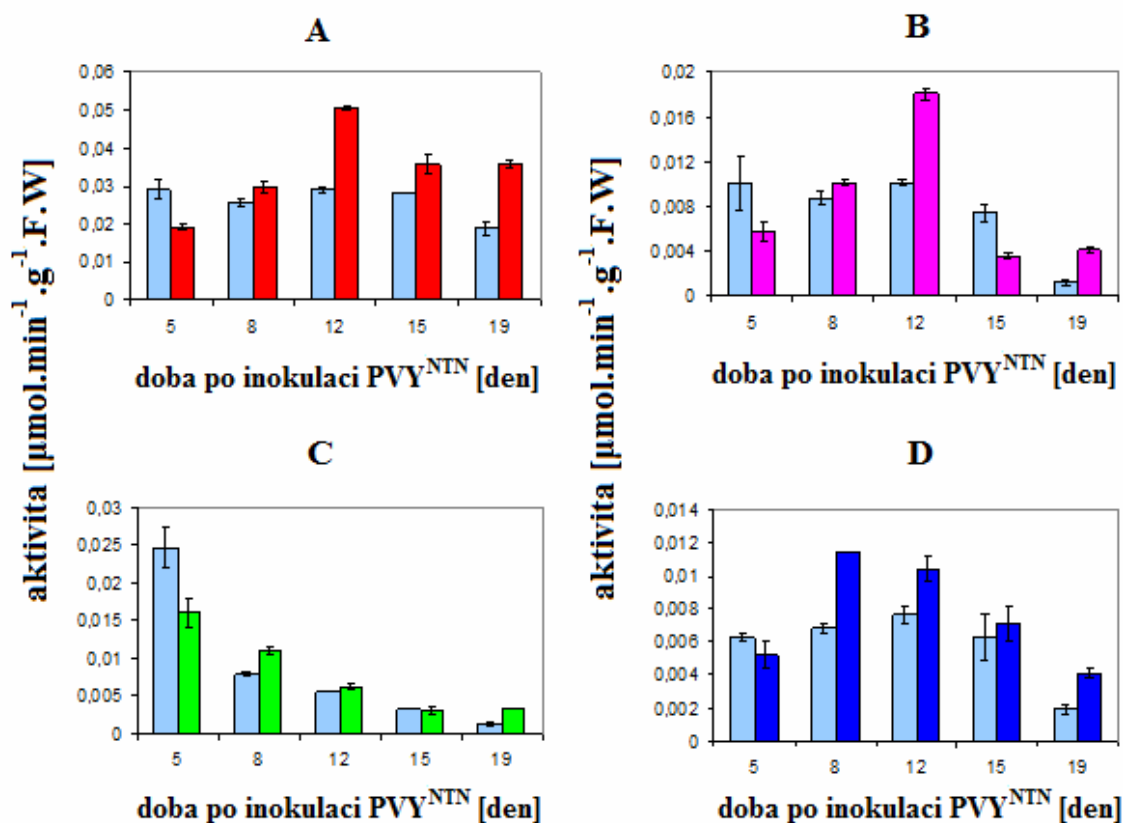
**Obr. č. 14:** Stanovení pH optima enzymu SDH v 100 mM Tris-HCl v rozmezí pH 6,8 – 8,4 a 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol-NaOH pufru v rozmezí pH 9-9.5.

#### 4.2 Vliv biotického stresu na aktivitu NADP-dependentních enzymů

V rostlinách tabáku (*Nicotina tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) infikovaných *Y virem bramboru* kmenem NTN (PVY<sup>NTN</sup>) a v kontrolních rostlinách, které infikovány nebyly (obr. 18 str. 44), byla stanovena aktivita vybraných NADP-dependentních enzymů: NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH a SDH. Aktivita těchto enzymů byla sledována ve 3 různých biologických experimentech po dobu 17-22 dnů po inokulaci PVY<sup>NTN</sup>. Vzorky byly odebírány v intervalu 3-5 dnů, přičemž aktivita byla stanovována každý odběrový den ve 3 směsných vzorcích V 1. pokusu byly rostliny pěstovány v zimě a po rozsazení byly umístěny v inkubačním boxu s umělým osvětlením a teplotou 20°C (světlo 14 h) a 10 °C (tma 10 h). Rostliny pokusu č. 2 a 3. byly pěstovány na podzim ve skleníku s umělým osvětlením. Pro každý pokus bylo použito 30 rostlin v každé skupině.

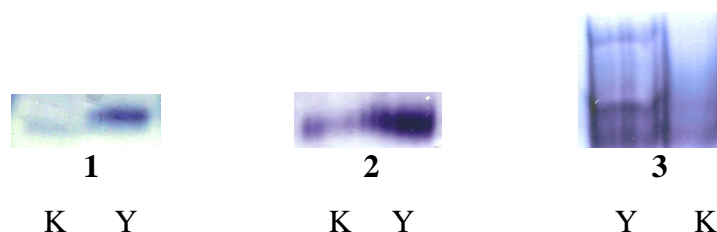
#### 4.2.1 Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v prvním pokusu

V listech tabáku infikovaných a kontrolních, neinfikovaných rostlin 1. pokusu byly porovnány aktivity sledovaných enzymů (obr. č. 15). U enzymů NADP-ME, NADP-ICDH a G6PDH byl zaznamenán nárůst aktivity oproti kontrolním rostlinám. U SDH byl v průběhu pokusu zjištěn pokles aktivity tohoto enzymu, a to jak u kontrolních tak u infikovaných rostlin, přičemž rozdíl v aktivitě infikovaných rostlin oproti kontrolním byl nevýrazný, s výjimkou 5. dne, kdy v infikovaných listech došlo ke snížení aktivity SDH. Aktivita NADP-ME byla nejvíce zvýšena 19. den po inokulaci (o 90 %), u G6PDH byl největší rozdíl v aktivitě zaznamenán 12. den po inokulaci (o 80 %). K nejvyššímu nárůstu aktivity NADP-ICDH došlo 8. den po inokulaci (o 70 %).



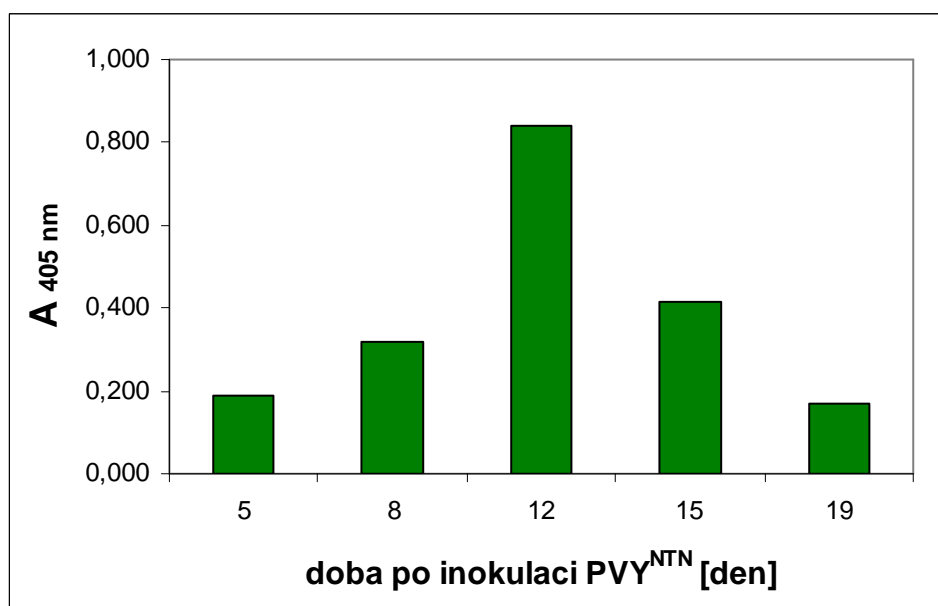
**Obr. č. 15:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku infikovaných virem PVY<sup>NTN</sup> vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době po inokulaci virem PVY<sup>NTN</sup> - výsledky prvního experimentu (■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrolní, neinfikované rostliny) A- NADP-ME, B- G6PDH, C- SDH, D- NADP-ICDH. Směrodatné odchylky byly vypočítány stanovením aktivity 3 různých směrných vzorků.

Rozdíly v aktivitě NADP-ICDH, G6PDH a NADP-ME kontrolních (K) a infikovaných rostlin (Y) byly ověřeny také detekcí aktivity v gradientovém gelu po nativní elektroforetické separaci ze vzorků odebraných 12. den po inokulaci PVY<sup>NTN</sup>. Z obrázků 16 je patrné zvýšení aktivity sledovaných enzymů ve stresovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním, neinfikovaným. Tím se potvrzují výsledky získané spektroskopickým měřením aktivit daných enzymů. Současně bylo nativní elektroforézou zjišťován počet isoformů studovaných enzymů. Jediný proužek zaznamenaný na gelu 1 a 2 naznačuje přítomnost jedné izoformy enzymu NADP-ICDH a G6PDH, dva proužky v gelu 3 poukazují na dvě isoformy NADP-ME v listech tabáku.



**Obr. č. 16:** Detekce aktivity (NADP-ICDH (1), G6PDH (2) a NADP-ME (3) v gelu po nativní elektroforéze v kontrolních (K) a infikovaných listech rostlin tabáku (Y). Do gelu byl aplikován stejný objem (25  $\mu$ l) vzorku.

Průběh infekce v listech tabáku byl potvrzen na základě imunochemické detekce množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> metodou ELISA. Na obrázku 17, str. 44 je patrné, že infekce dosáhla maxima v 12. den po inokulaci, což je zároveň i den, ve kterém došlo k nejvyššímu nárůstu aktivity G6PDH a NADP-ME tu také zaznamenala značný nárůst (o 70 % oproti rostlinám kontrolním).



**Obr. č. 17:** Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku v průběhu infekce metodou ELISA s využitím sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase. Vzniklý produkt absorbuje při 405 nm. (■ infikované rostliny)



**Obr. č. 18:** List tabáku neinfikovaný (nalevo) a list tabáku infikovaný virem PVY<sup>NTN</sup> (napravo) 12-tý den infekce.

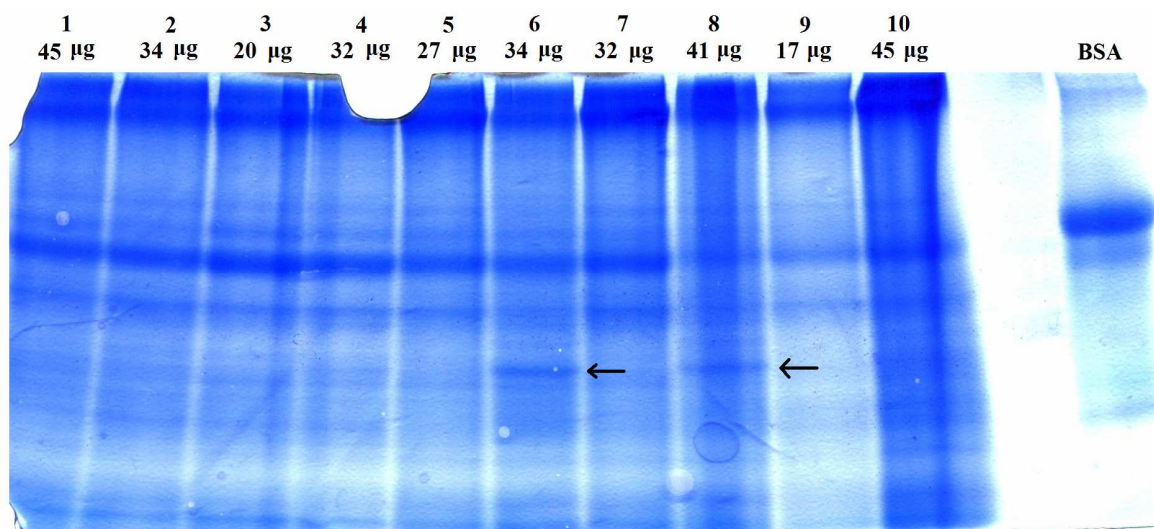
V rostlinných extraktech kontrolních a infikovaných rostlin tabáku byla rovněž 15. den po inokulaci stanovena koncentrace NADP<sup>+</sup> (tab. č. 1, str. 45). Množství NADP<sup>+</sup> bylo v infikovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním zvýšené. Koncentrace je vyjádřena v  $\mu\text{M}$  a byla stanovena spektrofotometricky enzymovou metodou.



**Tab. č. 1:** *Koncentrace  $\text{NADP}^+$  v listech kontrolních (kontrola) a infikovaných (stres) rostlin tabáku 15. den po inokulaci PVY<sup>NTN</sup>, vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$  se směrodatnou odchylkou stanovení.*

Vzorek	$c_{\text{NADP}^+}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Směrodatná odchylka ( $\mu\text{mol/l}$ )
Kontrola	7	0,5
Stres	13	0,8

Rozpustné bílkoviny byly detekovány v extraktech z listů PVY<sup>NTN</sup> infikovaných a kontrolních rostlin rozdělených v polyakrylamidovém gelu SDS elektroforetickou separací. V drahách č. 6 a č. 8 odpovídajících 12. a 16. dnu infekce od inokulace virem se objevily proužky, na obr. č. 19 vyznačené šipkami. Tyto proužky pravděpodobně odpovídají obalovému proteinu viru přítomnému ve vzorcích, neboť v dané dny došlo také k maximálnímu rozvinutí virové infekce. Molekulová hmotnost obalového proteinu PVY se pohybuje okolo 36 kDa.

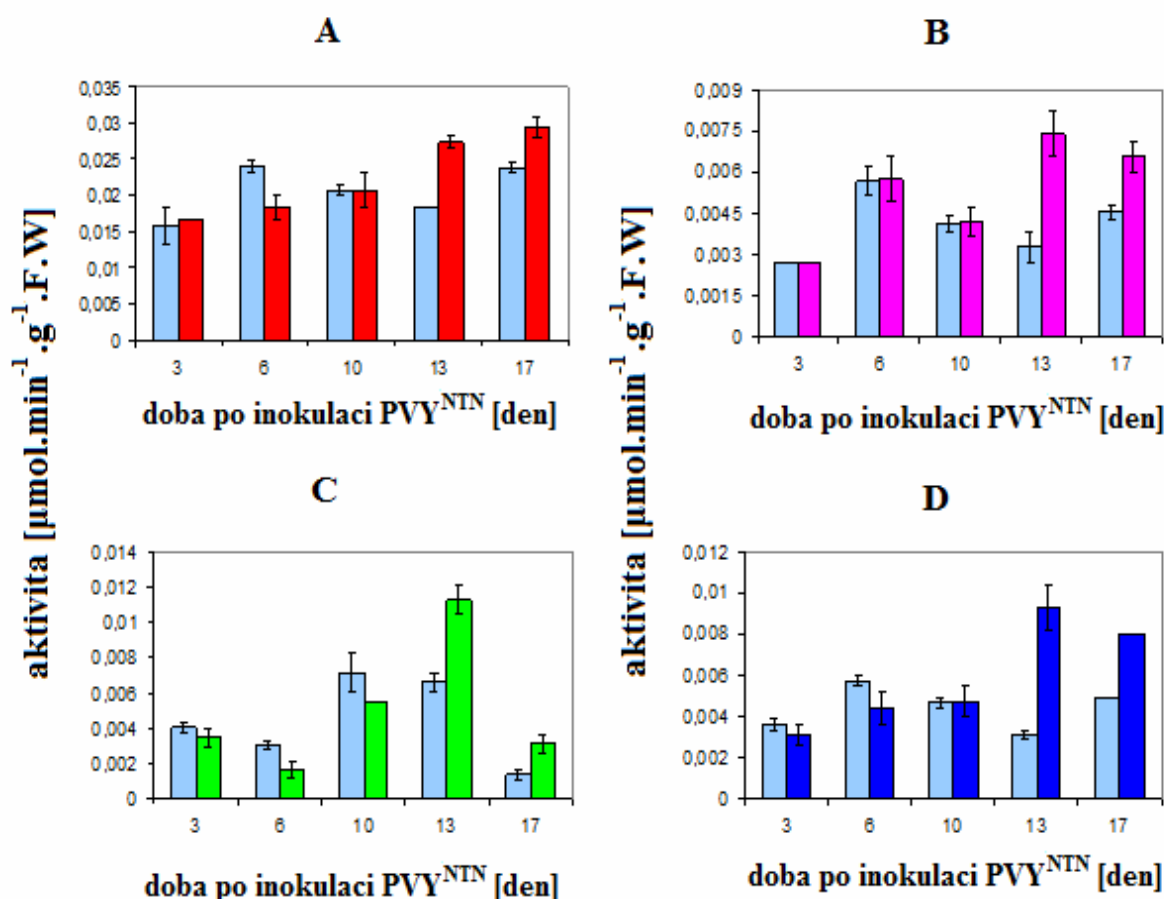


**Obr. č. 19:** *Detekce rozpustných bílkovin listů kontrolních (dráhy označené lichými čísly 1, 3, 5, 7, 9) a PVY<sup>NTN</sup> infikovaných rostlin (sudá čísla 2, 4, 6, 8, 10) v gelu po elektroforetické separaci v denaturujícím prostředí. Dráha č. 1 a 2 odpovídá **pátému** dni experimentu, dráha č. 3 a 4. **osmému**, dráha č. 5 a 6. **dvanáctému** dni, č. 7 a 8. **patnáctému** dni, č. 9 a 10 **devatenáctému** dni 1. pokusu. Číslo pod pořadovými odpovídají množství aplikovaných rozpustných proteinů, neboť byl aplikován stejný objem extraktu.*

Šipky označují pravděpodobný výskyt obalového proteinu PVY (36 kDa), dráha BSA obsahuje BSA s molekulovou hmotností 67 kDa.

#### 4.2.2 Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v druhém pokusu

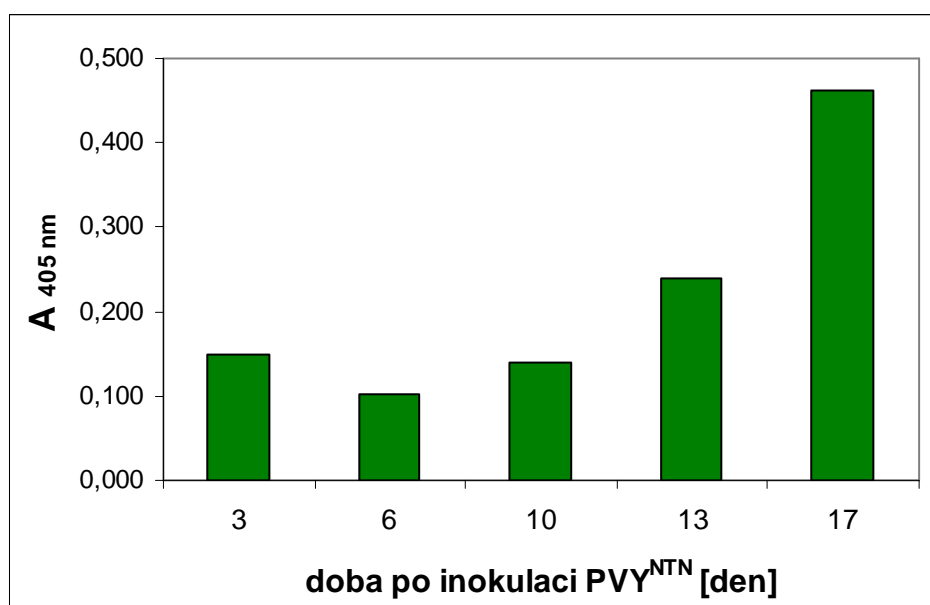
Výsledky prvního pokusu byly ověřeny dalšími 2 pokusy, aktivita studovaných enzymů byla sledována také v druhém opakování pokusu, na který byly použity rostliny pěstované na podzim ve skleníku s umělým osvětlením. Obrázek 20 zachycuje grafy zobrazující porovnání aktivity sledovaných enzymů v listech tabáku z infikovaných rostlin a z rostlin kontrolních, které infikovány nebyly. Nárůst aktivity v infikovaných listech oproti rostlinám kontrolním byl zaznamenán u všech sledovaných enzymů. Nejvyšší rozdíl v aktivitě enzymů kontrolních a infikovaných rostlin byl 13. den po inokulaci. Aktivita NADP-ME byla nejvíce zvýšena o 50 %. G6PDH zaznamenala zvýšení v aktivitě o 120 %. Aktivita SDH vzrostla o 60 % a NADP-ICDH o 200 %.



**Obr. č. 20:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku infikovaných virem PVY<sup>NTN</sup> vztahovaná na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení infekce- výsledky druhého

experimentu (■ ■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrola) **A-NADP-ME**, **B-G6PDH**, **C- SDH**, **D-NADP-ICDH**

Průběh infekce v listech tabáku byl potvrzen imunochemickou detekcí množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> metodou ELISA. Na obrázku 21 je patrné, že infekce dosáhla maxima v 17. den po inokulaci.



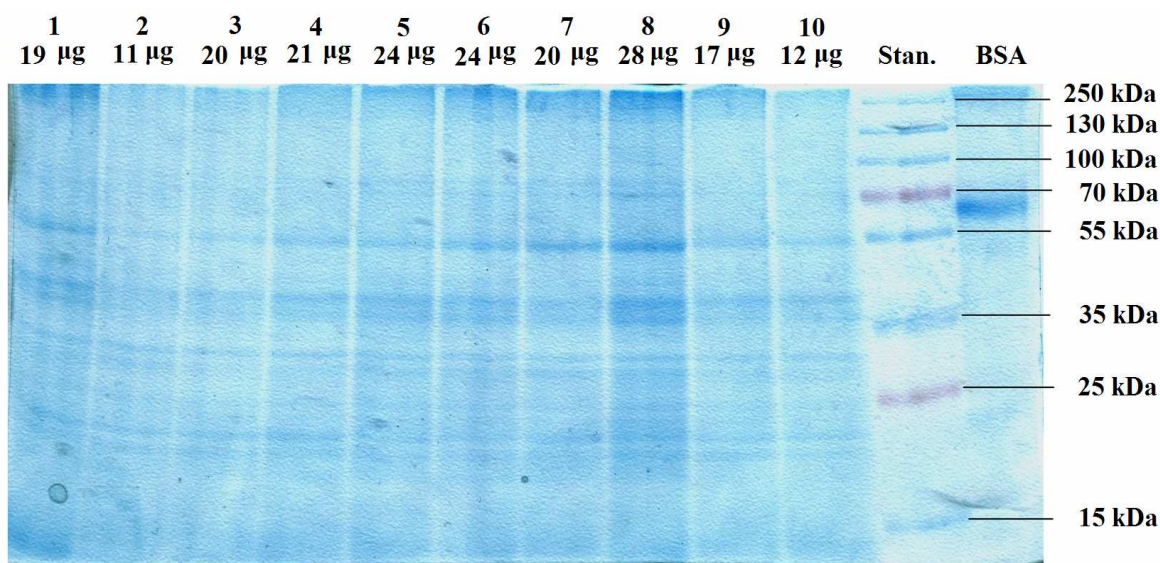
**Obr. č. 21:** Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku v průběhu infekce metodou ELISA s využitím sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase. Vzniklý produkt absorbuje při 405 nm. (■ infikované rostliny)

V rostlinných extraktech kontrolních a infikovaných rostlin tabáku byla opět spektrofotometricky enzymovou metodou stanovena koncentrace NADP<sup>+</sup>. Stanovení bylo provedeno ve vzorcích odebraných 13. den po inokulaci. Jak je patrné z tab. č. 2, str. 48, množství NADP<sup>+</sup> bylo v infikovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním zvýšené.

**Tab. č. 2:** *Koncentrace  $\text{NADP}^+$  v listech kontrolních (kontrola) a infikovaných (stres) rostlinách tabáku v 13. den po inokulaci, vyjádřena v  $\mu\text{mol/l}$  se směrodatnou odchylkou vypočítanou ze 3 stanovení.*

Vzorek	$c_{\text{NADP}^+}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Směrodatná odchylka ( $\mu\text{mol/l}$ )
Kontrola	25	1,4
Stres	36	2

Rozpustné proteiny extraktů infikovaných a zdravých listů tabáku byly detekovány po rozdělení v polyakrylamidovém gelu elektroforetickou separací v denaturujícím prostředí SDS (obr. č. 22.) Zdá se, že množství proteinu Rubisco (resp. velké podjednotky o molekulové hmotnosti kolem 55 kDa) není virovou infekcí výrazně ovlivněno.

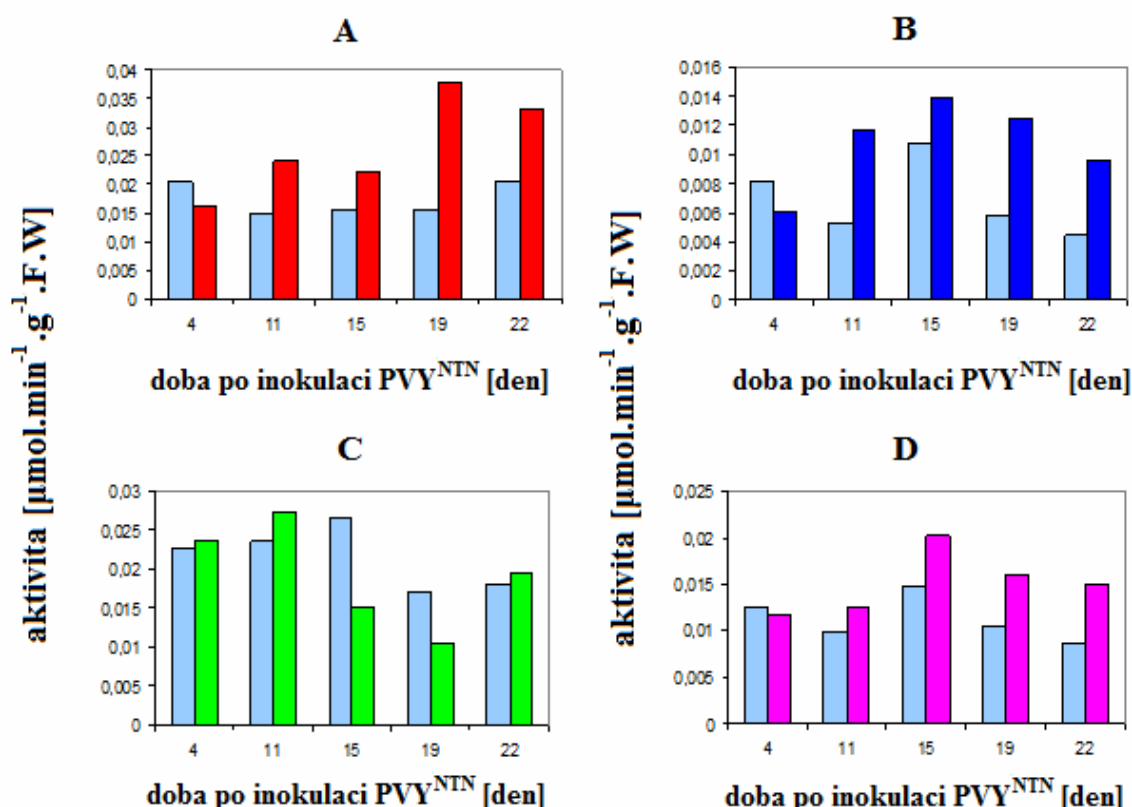


**Obr. č. 22:** *Detekce rozpustných bílkovin listů kontrolních (dráhy označené lichými čísly 1, 3, 5, 7, 9) a  $\text{PVY}^{\text{NTN}}$  infikovaných rostlin (sudá čísla 2, 4, 6, 8, 10) v gelu po elektroforetické separaci v denaturujícím prostředí. Dráha č. 1 a 2 odpovídá třetímu dni experimentu, dráha č. 3 a 4. šestému, dráha č. 5 a 6. desátému dni, č. 7 a 8. třináctému dni, č. 9 a 10 sedmnáctému dni 2. pokusu. Čísla pod pořadovými odpovídají množství aplikovaných rozpustných proteinů, neboť byl aplikován stejný objem. Dráha BSA obsahuje BSA s molekulovou hmotností 67 kDa. Označení Stan. odpovídá*

standardním proteinům, jejichž molekulová hmotnost v kDa je vyznačena po pravé straně. Nejvýraznější proužek odpovídá pravděpodobně velké podjednotce proteinu Rubisco, jejíž hmotnost se pohybuje okolo 55 kDa.

### 4.2.3 Vliv biotického stresu na aktivitu vybraných enzymů v třetím pokusu

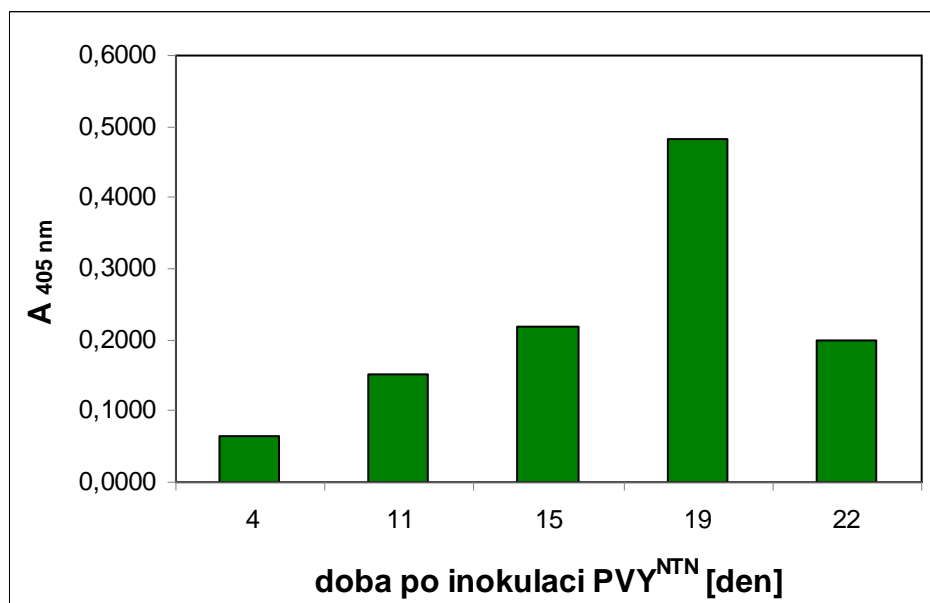
Sledování změn aktivit vybraných enzymů vlivem PVY<sup>NTN</sup> bylo opakováno i potřetí, v rostlinách pěstovaných na podzim ve skleníku s umělým osvětlením. Stanovením aktivit NADP-dependentních enzymů v kontrolních, neinfikovaných a PVY<sup>NTN</sup> infikovaných rostlinách byl opět zaznamenán nárůst aktivity NADP-ME, NADP-ICDH a G6PDH oproti kontrolním rostlinám, naopak u SDH byl zjištěn vůči kontrolním rostlinám pokles aktivity (obr. č. 23). NADP-ME a NADP-ICDH zaznamenaly nejvyšší rozdíl v aktivitě 19. den po inokulaci (o 140 % a 115 %), G6PDH 22. den po inokulaci (o 70 %). Aktivita SDH v infikovaných rostlinách oproti kontrolním nejvíce poklesla 15. den po inokulaci a nižší byla i 19. den.



**Obr. č. 23:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku infikovaných virem PVY<sup>NTN</sup> vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení infekce- výsledky třetího

experimentu (■ ■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrola) **A**-NADP-ME, **B** - NADP-ICDH, **C**-SDH, **D**-G6PDH

Průběh infekce v rostlinách tabáku vystavených PVY<sup>NTN</sup> byl opět sledován imunochemickou metodou ELISA. Z obrázku 24 vyplývá, že infekce dosáhla maxima 19. den po inokulaci, což je zároveň i den, ve kterém došlo k významnému zvýšení aktivit NADP-ME, G6PDH a ICDH.



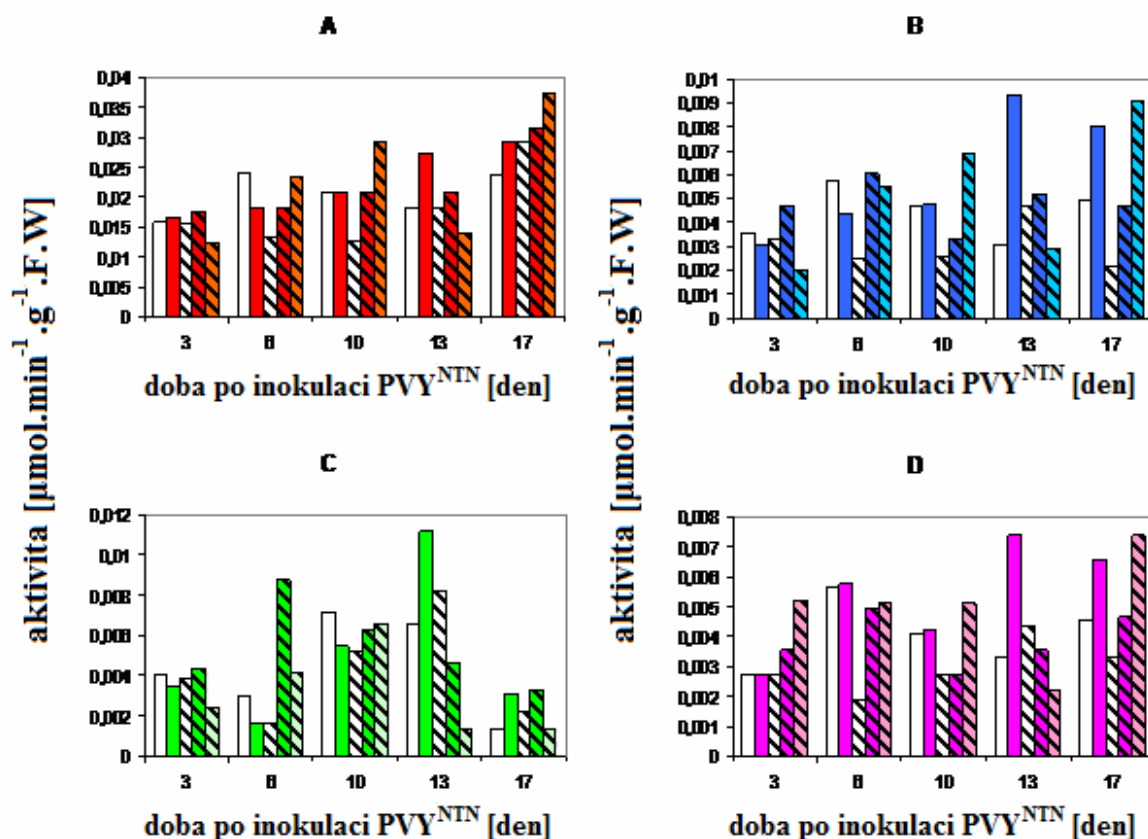
**Obr. č. 24:** Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku v průběhu infekce metodou ELISA s využitím sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase. Vzniklý produkt absorbuje při 405 nm. (■ infikované rostliny)

#### 4.2.4 Kombinace infekce PVY<sup>NTN</sup> a teplotního šoku

Vzhledem k tomu, že na obrannou odpověď rostlin může mít vliv teplotní šok, byla aktivita studovaných enzymů v listech tabáku také sledována i v souvislosti s virovou infekcí kombinovanou s teplotním šokem. Aktivita NADP-dependentních enzymů byla zjišťována v listech pěti skupin rostlin: i) skupina rostlin kontrolních, které infikovány nebyly (K), ii) skupina infikovaných rostlin (Y), iii) skupina infikovaných rostlin, které byly nejprve infikovány a poté vystaveny teplotnímu šoku (YHS), iv) skupina kontrolních rostlin, které nebyly infikovány ale byly vystaveny teplotnímu šoku (KHS) a v) skupina rostlin nejprve vystavených zvýšené teplotě a až poté infikovaných (HSY). Teplotní šok



představovalo vystavení rostlin teplotě 40°C po dobu 2 hodin. Samotný teplotní šok (KHS) a teplotní šok aplikovaný po inokulaci PVY<sup>NTN</sup> (YHS) nezpůsobily výrazné změny v aktivitách sledovaných enzymů oproti kontrolní skupině (K). Teplotní šok následovaný virovou infekcí (HSY) způsobil nárůst aktivity NADP-ME, NADP-ICDH a G6PDH a naopak snížení aktivity SDH, a to jak v porovnání s pouze infikovanými rostlinami (Y), tak v porovnání s rostlinami vystavenými pouze teplotnímu šoku (KHS). K nejvyššímu nárůstu NADP-ME (o 29 %), G6PDH (o 125 %) a NADP-ICDH (o 313 %) v HSY rostlinách došlo 17. den po inokulaci (obr. č. 25).



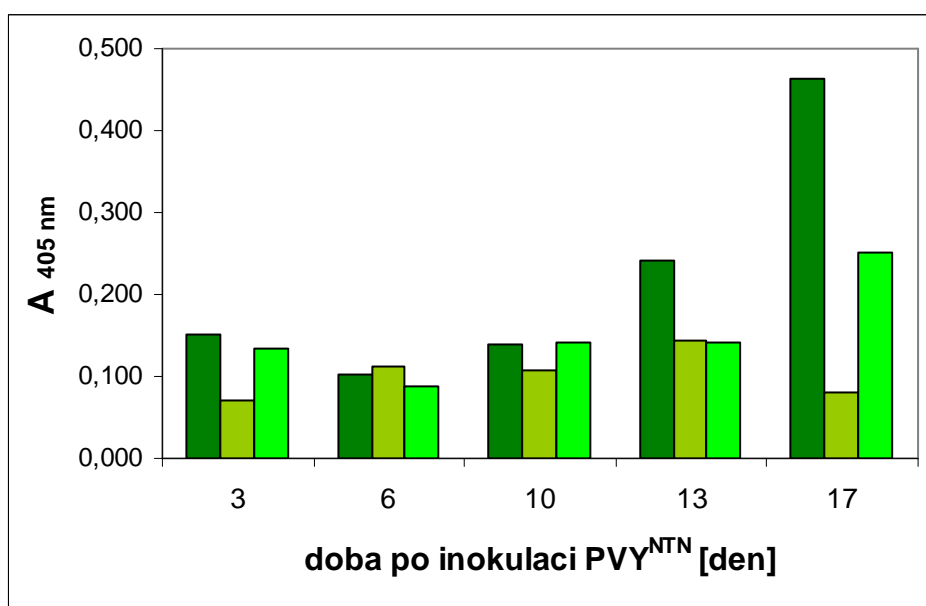
**Obr. č. 25:** Aktivita sledovaných enzymů v listech kontrolních rostlin  $\square$ , listech tabáku infikovaných virem PVY<sup>NTN</sup>  $\blacksquare$   $\blacksquare$   $\blacksquare$  a rostlin vystavených teplotnímu šoku (šrafované sloupce) vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení infekce. A-NADP-ME, B - NADP-ICDH, C- SDH, D-G6PDH

$\square$  kontrolní rostliny neinfikované, ale vystavené teplotnímu šoku (KHS)

$\blacksquare$   $\blacksquare$   $\blacksquare$   $\blacksquare$  rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku (YHS)

$\blacksquare$   $\blacksquare$   $\blacksquare$   $\blacksquare$  rostliny infikované po vystavení teplotnímu šoku (HSY)

Průběh infekce ve 3 skupinách infikovaných rostlin: rostlin tabáku vystavených před inokulací teplotnímu šoku (HSY), rostlin vystavených po inokulaci teplotnímu šoku (YHS), stejně jako v infikovaných rostlinách bez působení teplotního šoku (Y), byl opět sledován imunochemicky metodou ELISA. Touto metodou bylo zjištěno, že rostliny, které nebyly vystaveny teplotnímu šoku (Y) dosáhly maxima infekce 17. den po inokulaci, stejně jako rostliny HSY, které byly infikovány až po vystavení teplotnímu šoku. Bez působení teplotního šoku (Y) byl patrný vyšší relativní obsah viru než u rostlin vystavených vyšší teplotě, ať již před, anebo po inokulaci (HSY, YHS). Např. 17. den byl relativní obsah viru v Y až 2-krát vyšší než v HSY a v HSY až 3-krát vyšší než obsah viru v YHS. Srovnání je možné díky použití jedné mikrotitrační destičky. V rostlinách nejprve infikovaných a poté vystavených teplotnímu šoku (YHS) byl relativní obsah viru nízký, maximum infekce bylo zjištěno 13. den (obr. č. 26).

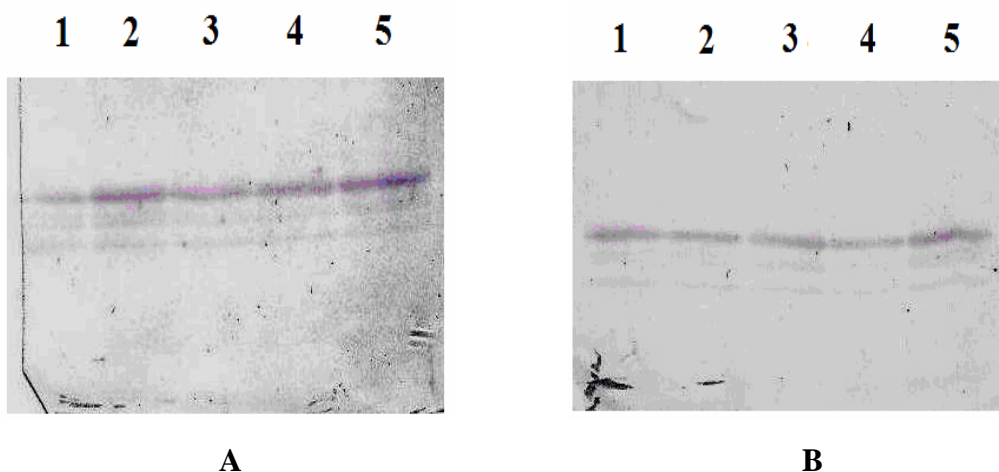


**Obr. č. 26:** Imunochemická detekce množství obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku v průběhu infekce metodou ELISA s využitím sekundární protilátky značené alkalickou fosfátasou. Vzniklý produkt absorbuje při 405 nm. (■ PVY<sup>NTN</sup> infikované rostliny bez působení teplotního šoku (Y), ■ rostliny infikované a poté vystavené teplotnímu šoku (YHS), ■ rostliny infikované po vystavení teplotnímu šoku (HSY))

Přítomnost HSP 70 v listech rostlin tabáku vystavených infekci a teplotnímu šoku byla zjišťována imunochemicky na nitrocelulosové membráně s přenesenými proteiny



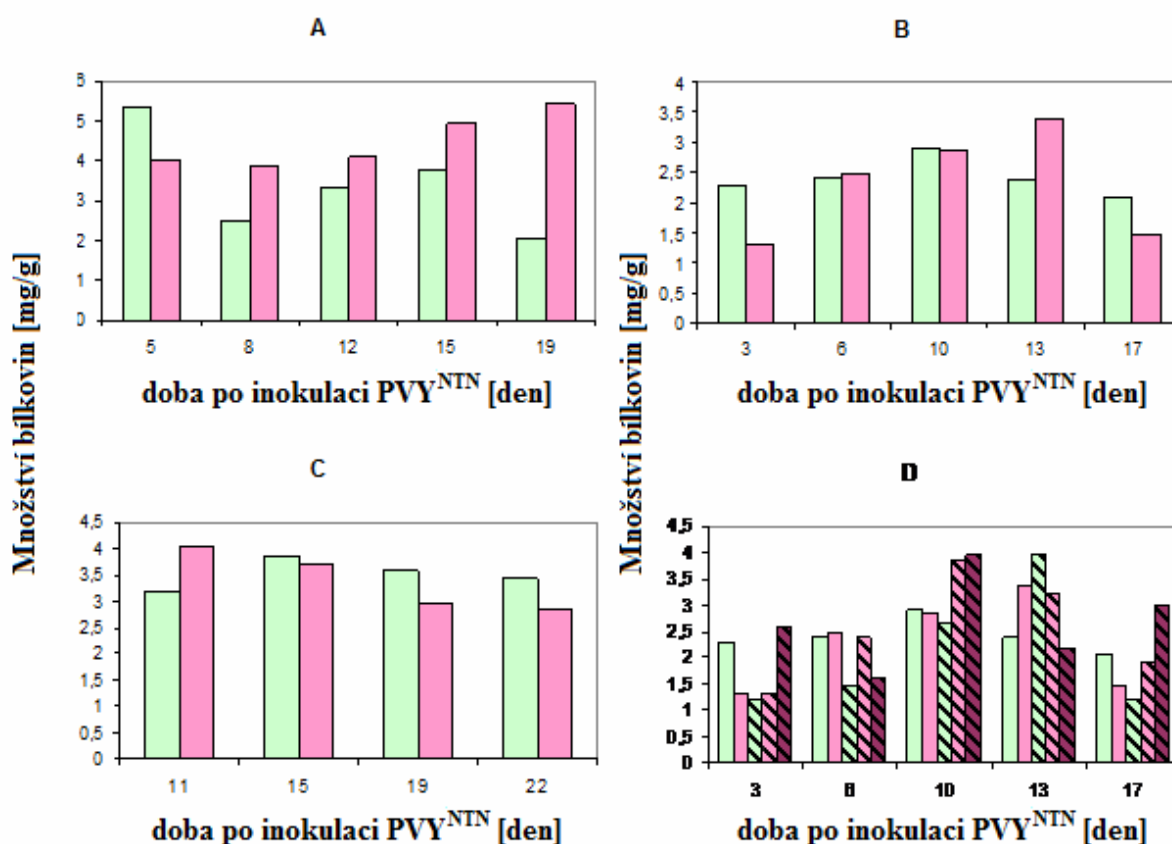
z gelu po elektroforetické separaci v denaturujícím prostředí. Proteiny byly na membránu přeneseny metodou western blot. Proužek s molekulovou hmotností odpovídající HSP 70 byl nalezen u všech skupin rostlin: kontrolních (K, KHS) i vystavených stresu (Y, YHS, HSY). Na obr. 27 A dokumentujícího přítomnost proteinu HSP 70 třetí den průběhu pokusu se zdá, že ve vzorcích nevystavených infekci ani vyšší teplotě (K) je přítomnost HSP 70 oproti ostatním vzorkům výrazně nižší, naopak nejsilnější proužek odpovídá rostlinám nejprve vystaveným teplotnímu šoku a poté infikovaným (HSY). 6. den po inokulaci a působení teplotního šoku již nejsou viditelné žádné výraznější změny v množství HSP 70 v jednotlivých vzorcích (obr. č. 27 B).



**Obr. č. 27:** *Specifická imunochemická detekce HSP 70 přítomného v extraktech rostlin vystavených teplotnímu šoku a kombinaci virové infekce a teplotnímu šoku 3. den průběhu pokusu (A) a 6. den průběhu pokusu (B). Detekce byla provedena na nitrocelulosové membráně po přenesení proteinů z gelu metodou western blot.*

- 1-rostliny kontrolní, neinfikované (K), nanesené množství bílkovin 19 µg (A), 20 µg (B)*
- 2-kontrola neinfikována a vystavená teplotnímu stresu (KHS), nanesené množství bílkovin 10 µg (A), 12 µg (B)*
- 3-infikované vzorky bez teplotnímu stresu (Y), nanesené množství bílkovin 11 µg (A) 21 µg (B);*
- 4-vzorky infikovány a poté vystaveny teplotnímu stresu (YHS), nanesené množství bílkovin 11 µg (A), 19 µg (B);*
- 5-vzorky vystaveny teplotnímu stresu a poté infikovány (HSY), nanesené množství bílkovin 21 µg (A) 14 µg (B);*

Ve všech experimentech vystavení PVY<sup>NTN</sup> a experimentech vystavení rostlin virové infekci v kombinaci s tepelným stresem byl stanoven obsah rozpustných bílkovin. V listech tabáku infikovaných PVY<sup>NTN</sup> a v kontrolních neinfikovaných rostlinách bylo stanovení obsahu bílkovin provedeno dle Bradfordové. V prvním pokusu byla koncentrace bílkovin v infikovaných rostlinách zvýšena oproti koncentraci v rostlinách kontrolních. K nejvyššímu nárůstu došlo 19. den po inokulaci, o 160 % (obr. č. 28 A). V 2. a 3. pokusu nebyl nárůst proteinů již tolik patrný, pouze 13. den v druhém pokusu došlo v listech infikovaných k nárůstu rozpustných proteinů o 43 %. (obr. č. 28 B, C).



**Obr. č. 28:** Obsah rozpustných bílkovin vztažený na čerstvou hmotnost v listech rostlin kontrolních (■), PVY<sup>NTN</sup> infikovaných rostlin (■) a rostlin vystavených teplotnímu šoku (YHS), (HSY ■) (šrafované sloupce) ze všech experimentech v závislosti na době působení PVY<sup>NTN</sup>. Obsah bílkovin byl stanovený dle Bradfordové. **A**-první pokus; **B**- druhý pokus; **C**-třetí pokus; **D**-kombinace infekce a teplotního šoku

Změny množství rozpustných bílkovin ve vzorcích z pokusu teplotního šoku kombinovaného s virovou infekcí jsou zachyceny na obr. č. 28 D. Obsah rozpustných bílkovin v rostlinách infikovaných a vystavených teplotnímu šoku, ať již před, anebo

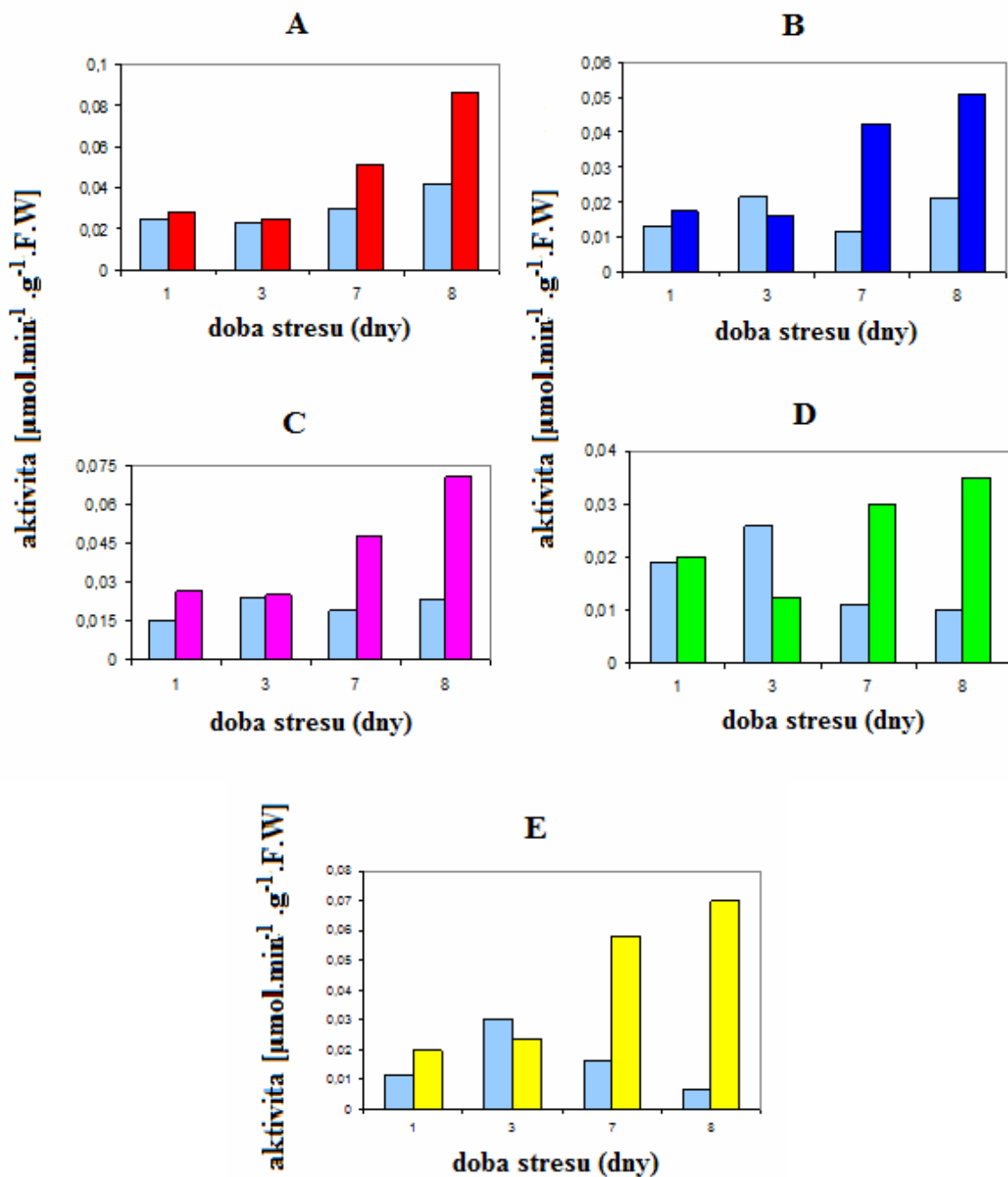
po inokulaci (HSY, YHS) se oproti kontrolním rostlinám vystavených teplotnímu šoku (KHS) a rostlinám pouze infikovaným (Y) zvýšil nejvíce 10. den po inokulaci.

### **4.3 Vliv solného stresu na aktivitu NADP-dependetních enzymů**

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda také vlivem působení abiotického stresu (100 mM NaCl) dojde v rostlinách tabáku (*Nicotina tabacum* L.) ke změně aktivit studovaných NADP-dependetních enzymů. Rostliny pěstované 6 týdnů od rozsazení v půdě byly z půdy vyjmuty a po očištění kořenů tekoucí vodou byly rozděleny do 2 skupin. Pět rostlin bylo ponořeno do 1l nádoby se 100 mM NaCl; dalších pět kontrolních rostlin bylo ponořeno do stejně velké nádoby obsahující destilovanou vodu. V průběhu 8 dní byly průběžně v intervalu 1-3 dnů odebrány směsné vzorky, ve kterých byla stanovené aktivity těchto enzymů: NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH, SDH a NP-GPD. Celkem byly provedeny 3 biologické pokusy, ve kterých byly použity různě velké rostliny.

#### **4.3.1 Vliv solního stresu na aktivitu vybraných enzymů v prvním pokusu**

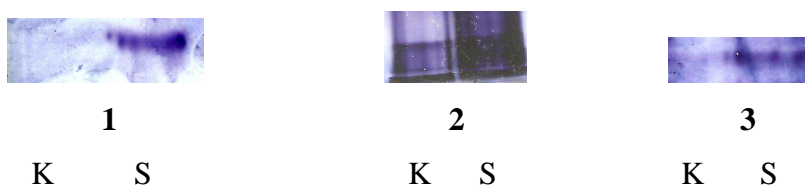
V prvním pokusu se 6 týdnů starými rostlinami, byla délka prvních plně vyvinutých listů pokusných rostlin 7 cm. Vysoká koncentrace soli (100 mM NaCl) způsobila nárůst aktivity všech sledovaných enzymů v porovnání s rostlinami kontrolními. U NADP-ME, G6PDH, SDH a NP-GPD byl největší rozdíl v aktivitě zaznamenán 8. den působení soli. Enzym NADP-ME byl tento den zvýšený 2-krát, G6PDH 3-krát, SDH 3,5-krát a NP-GPD 10-krát. NADP-ICDH byla nejvíce zvýšena 3,5-krát 7. den od začátku působení soli (obr. č. 29, str. 56).



**Obr. č. 29:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku vystavených solnému stresu vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení stresu- výsledky prvního experimentu (■ ■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrola) **A**-NADP-ME, **B** - NADP-ICDH, **C**-G6PDH, **D**- SDH, **E**- NP-GPD

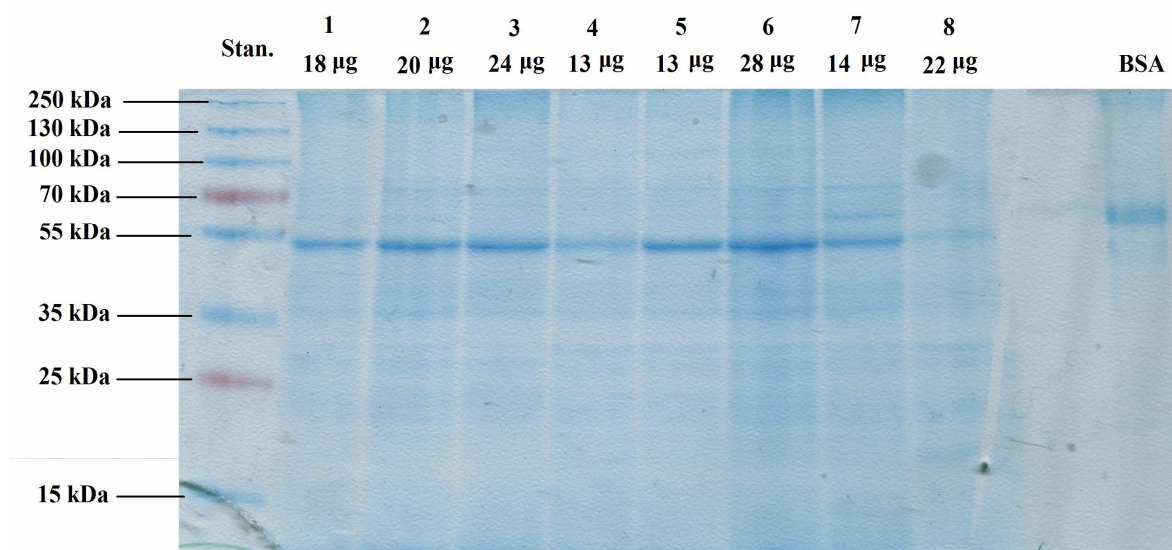
Aktivita NADP-ICDH, G6PDH a NADP-ME v listech kontrolních (K) a solí stresovaných rostlin (S) byla detekována v gradientovém gelu po nativní elektroforetické

separaci vzorků odebraných 8. den od začátku působení soli. Ze získaných výsledků je viditelné zvýšení aktivity sledovaných enzymů ve stresovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním (obr. č. 30), což potvrzuje výsledky získané spektrofotometrickým měřením aktivit sledovaných enzymů. Současně bylo nativní elektroforézou zjišťován počet isoformů sledovaných enzymů. Jediný proužek zaznamenaný na gelu 1 a 2 naznačuje přítomnost jedné izoformy enzymu NADP-ICDH a G6PDH, dva proužky v gelu 3 poukazují na dvě izoformy NADP-ME.



**Obr. č. 30:** Specifická detekce aktivity (NADP-ICDH (1), G6PDH (2) a NADP-ME (3) v gelu po nativní elektroforéze v kontrolních (K) a solí stresovaných (S) rostlinách tabáku.

Rozpuštěné proteiny z extraktů stresovaných a kontrolních rostlin tabáku byly detekovány v polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci v denaturujícím prostředí SDS (obr.č. 31) Množství proteinu Rubisco (resp. velké podjednotky o molekulové hmotnosti 55 kDa odpovídající nejvýraznějšímu proužku) 8. den výrazně pokleslo.



**Obr. č. 31:** Detekce rozpustných bílkovin v listech kontrolních rostlin (lichá čísla 1, 3, 5, 7) a rostlin vystavených působení 100 mM NaCl (sudá čísla 2, 4, 6, 8) v gelu po

elektroforetické separaci v denaturujícím prostředí. Dráha č. 1 a 2 odpovídá **prvnímu** dni působení stresu, dráha č. 3 a 4 **třetímu** dni stresu, dráha č. 5 a 6 **sedmému** dni a dráha č. 7 a 8 **osmému** dni působení solného stresu. Čísla pod pořadovými čísly odpovídají množství (μg) aplikovaných rozpustných bílkovin do gelu, neboť byl aplikován stejný objem vzorků. Označení Stan. odpovídá standardním proteinům o molekulové hmotnosti v kDa vyznačené po pravé straně, dráha s označením BSA obsahuje protein BSA o molekulové hmotnosti 67 kDa. Nejvýraznější proužek odpovídá pravděpodobně velké podjednotce proteinu Rubisco, jejíž hmotnost se pohybuje okolo 55 kDa.

V listech kontrolních a solí stresovaných rostlin tabáku byla metodou AES stanovena koncentrace sodných iontů v průběhu pokusu. Koncentrace je uvedena v g/l i v mol/l. Koncentrace sodných iontů v kontrolních rostlinách zůstávala skoro ve všech dnech přibližně stejná, kdežto v rostlinách stresovaných zvýšeným obsahem Na<sup>+</sup> byla až 4x vyšší než v kontrolních rostlinách. Tohoto maxima rostliny dosáhly 3. den působení stresu. Následující dny už rozdíl vůči kontrolním rostlinám nebyl takový, sedmý den bylo ve stresovaných rostlinách zjištěno 2,6-násobné zvýšení obsahu Na<sup>+</sup> iontů (tab. č. 3).

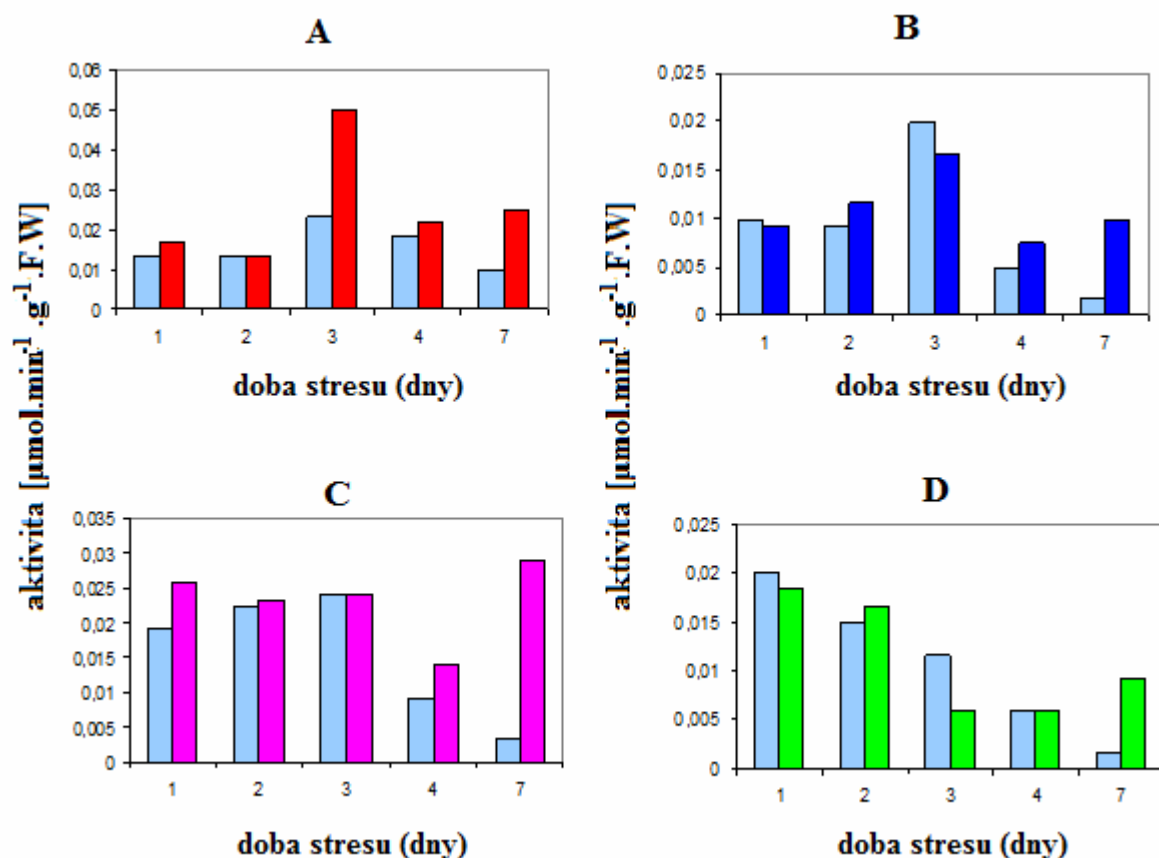
**Tab. č. 3:** Koncentrace sodných iontů v listech kontrolních (*k*) a solí stresovaných (*s*) rostlin tabáku v průběhu pokusu stanovená pomocí AAS.

den	kontrola/stres	c (g/l)	c (mol/l)
<b>1</b>	k	1,51	0,07
	s	2,66	0,12
<b>2</b>	k	1,22	0,05
	s	1,37	0,06
<b>3</b>	k	2,12	0,09
	s	8,55	0,37
<b>7</b>	k	1,52	0,07
	s	3,98	0,17

#### 4.3.2 Vliv solného stresu na aktivitu vybraných enzymů ve druhém pokusu

Pokus působení solného stresu byl opakován. Nejprve se stejně velkými a starými rostlinami jako v prvním pokusu. I v těchto experimentech byl zaznamenán nárůst aktivity všech sledovaných enzymů. Aktivity G6PDH, NADP-ICDH a SDH byly oproti kontrolním

roślinám nejvíce zvýšené 7. den působení soli. Aktivita G6PDH se zvýšila o 770 %, NADP-ICDH o 500 % a aktivita SDH o 450 %. Aktivita NADP-ME byla nejvíce zvýšená 3. den působení soli, a to o 110 % vůči kontrolám (obr. č. 32).

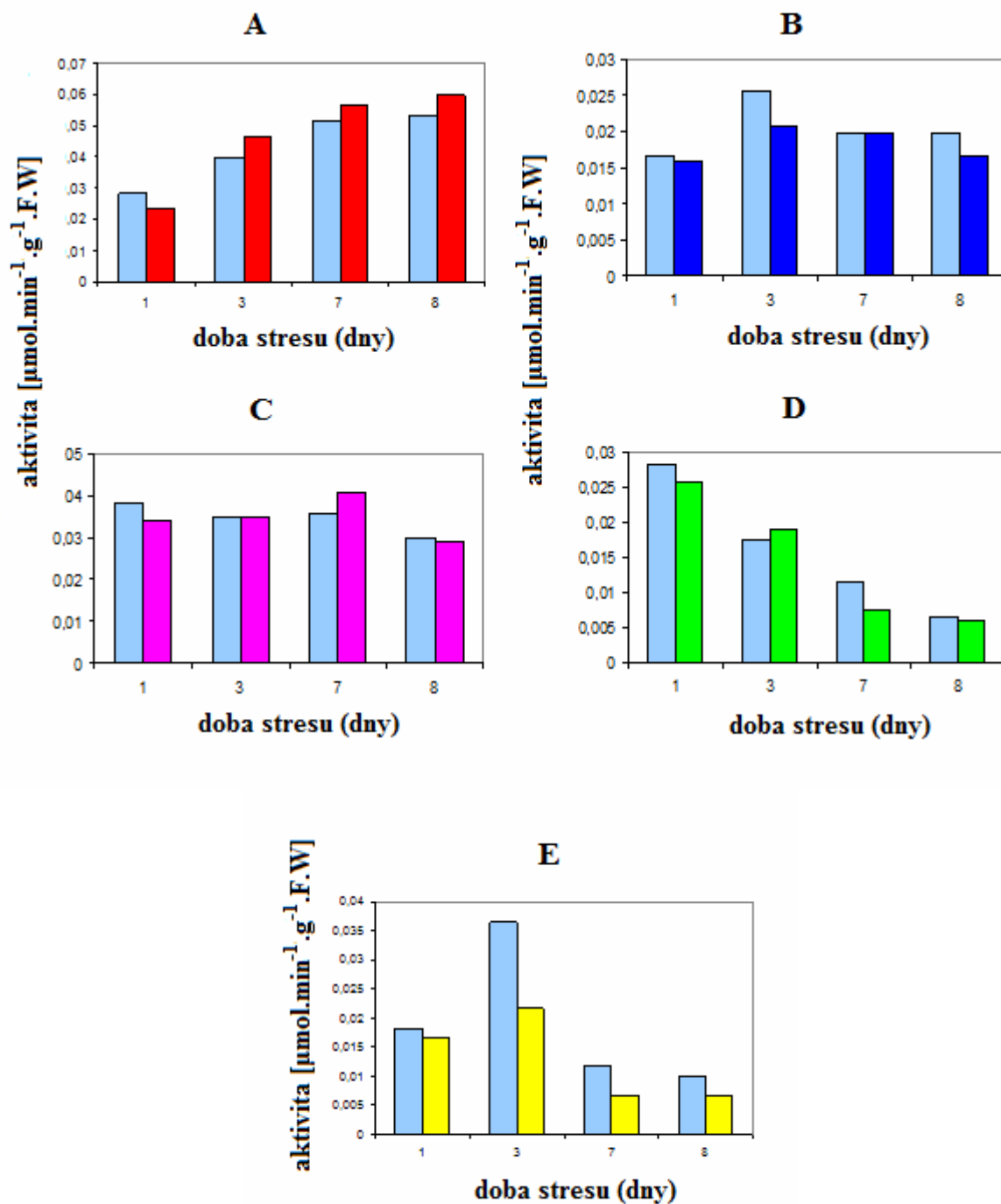


**Obr. č. 32:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku vystavených solnému stresu vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení stresu- výsledky druhého experimentu (■ ■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrola) **A**-NADP-ME, **B** - NADP-ICDH, **C**-G6PDH, **D**- SDH

#### 4.3.3 Vliv solného stresu na aktivitu vybraných enzymů ve třetím pokusu

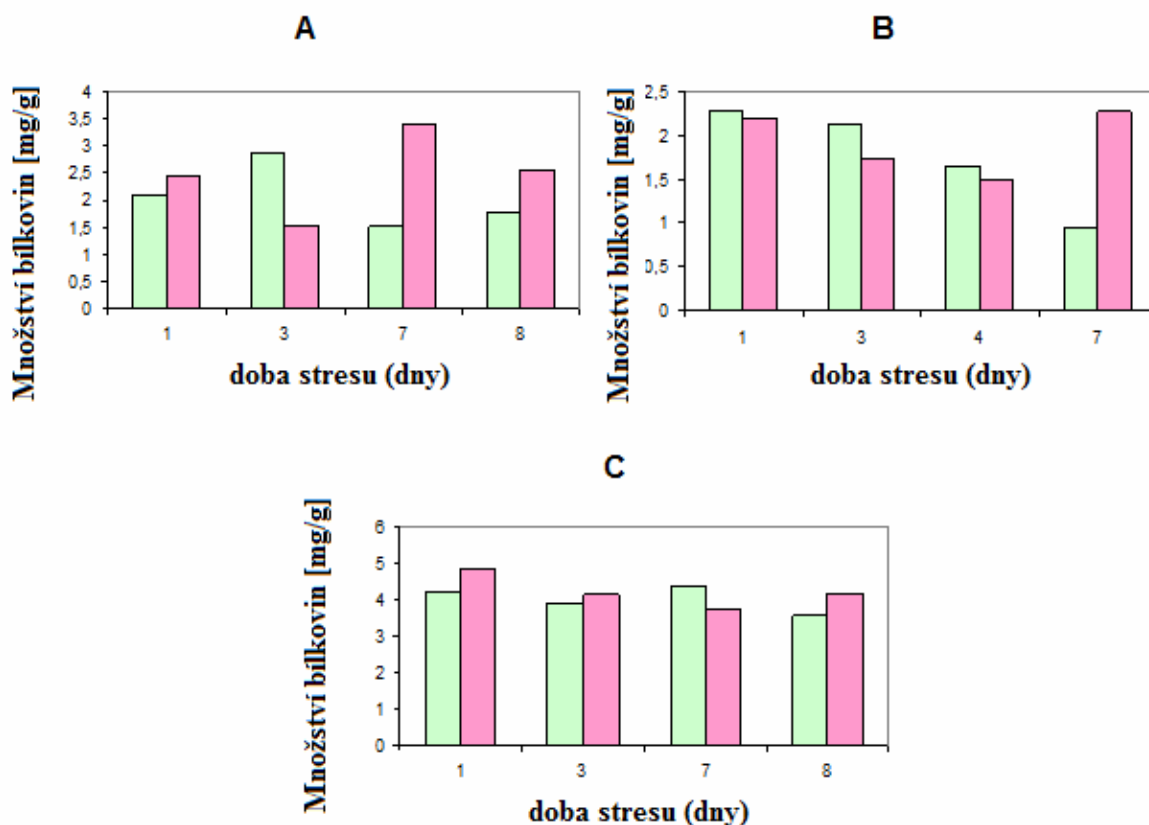
Ve třetím experimentu sledování aktivit vybraných enzymů v rostlinách stresovaných 100 mM NaCl byly jako pokusné rostliny použity větší rostliny, 6 týdnů staré, s délkou prvních plně vyvinutých listů 12,5 cm. Na obr. č. 33 str. 60 jsou znázorněny zjištěné aktivity sledovaných enzymů v listech rostlin stresovaných solným stresem a v listech rostlin kontrolních. V tomto pokusu nebyl zaznamenán nárůst aktivity ani u jednoho

enzymu. V případě NP-GPD byla aktivita tohoto enzymu nižší, než v kontrolních rostlinách (obr. 33 E, str. 60).



**Obr. č. 33:** Aktivita sledovaných enzymů v listech tabáku vystavených solnému stresu vztažená na čerstvou hmotnost v závislosti na době působení stresu- výsledky třetího experimentu (■ ■ ■ ■ ■ stresované rostliny, - ■ kontrola) **A**-NADP-ME, **B** - NADP-ICDH, **C**-G6PDH, **D**- SDH, **E**- NP-GPD





**Obr. č. 34:** Obsah rozpustných bílkovin vztažený na čerstvou hmotnost v listech rostlin tabáku vystavených solnému stresu (■) a v listech rostlin kontrolních (■), které v přítomnosti soli nebyly. Obsah bílkovin byl stanovený dle Bradfordové. **A**-první pokus, **B**- druhý pokus, **C**-třetí pokus

V listech rostlin tabáku vystavených solnému stresu a rostlin kontrolních byl stanoven obsah rozpustných bílkovin. Stanovení bylo provedeno se vzorky z průběhu všech 3 pokusů postupem dle Bradfordové. V prvním pokusu se obsah rozpustných bílkovin ve stresovaných rostlinách 7. den působení stresu více než 2-krát zvýšil oproti rostlinám kontrolním. (obr. č. 34 A).

Stanovení obsahu proteinů v listech rostlin druhého pokusu také ukázalo, že se množství bílkovin ve stresovaných rostlinách oproti kontrolním rostlinám zvýšilo. K největšímu zvýšení obsahu rozpustných bílkovin ve stresovaných rostlinách došlo 7. den působení solného stresu, přičemž zvýšení obsahu bylo více než dvojnásobné (obr. č. 34 B). Ve třetím pokusu působení solného stresu na starší rostliny tabáku byl obsah bílkovin v kontrolních a stresovaných srovnatelný (obr. č. 34 C).

## 5 Diskuse

Rostliny se v průběhu svého života musí vypořádat s množstvím nepříznivých faktorů omezujících jejich růst a zdravý vývoj. Faktory ohrožující rostliny mohou mít biotickou i abiotickou povahu. V této práci byl studován jak stres biotický, způsobený *Y virem bramboru*, tak abiotický působený vysokou koncentrací soli či vlivem teplotního šoku na rostliny *Nicotiana tabacum* L. Rovněž bylo studováno, jaký vliv na experimentální rostliny bude mít kombinace teplotního šoku s virovou infekcí. Pro všechny tyto typy stresu je společné snížení fotosyntézy, zvýšení respirace, přítomnost vyššího množství ROS a metabolické změny [91]. Rostliny si vyvinuly celou řadu obranných mechanismů sloužících k vypořádání se s nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí. Tyto obranné schopnosti byly a stále jsou předmětem intenzivního výzkumu, neboť jejich důkladné porozumění je klíčem k vyřešení problému zvýšení odolnosti a tím i výnosnosti zemědělsky významných rostlin.

Ze studií jednotlivých NADP-dependentních enzymů vyplývá, že se rovněž mohou účastnit obranných odpovědí v souvislosti s různými formami stresu především díky tomu, že produkují redukční ekvivalenty ve formě NADPH [1,6]. Tento koenzym je významným substrátem celé řady metabolických procesů jako je syntéza mastných kyselin, aminokyselin, osmoticky aktivních látek a množství sekundárních metabolitů podílejících se i na obraně vůči stresu. V období překonávání stresových podmínek je zapotřebí zvýšeného množství těchto metabolitů. NADPH se podílí i na ochraně rostlinných buněk proti oxidativnímu poškození, neboť slouží jako koenzym i pro klíčové enzymy askorbát-glutathionového cyklu (Halliwell-Asadaova cyklu), jehož úloha spočívá v odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS) vznikajících kromě jiného i jako součást obrany proti napadení patogenem či abiotickému stresu [3].

Avšak studie, ve kterých by byly podrobně sledovány více jak 2 NADP-dependentní enzymy v souvislosti s několika různými typy stresu podle dostupných informací zatím provedeny nebyly. Cílem této diplomové práce bylo současně sledovat aktivitu důležitých NADP-dependentních enzymů (NADP-ICDH, G6PDH, NADP-ME a NP-GPD) poskytujících NADPH a enzymu, který je součástí biosyntetické dráhy spotřebovávající NADPH (SDH) v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) vystavených biotickému stresu ve formě virové infekce způsobené *Y virem bramboru*

kmenem NTN a v rostlinách tabáku vystavených zvýšené koncentraci soli (100 mM NaCl). Dalším cílem bylo sledovat vliv teplotního šoku v kombinaci s působením virové infekce na aktivitu těchto enzymů v rostlinách tabáku. Výsledky byly porovnávány s kontrolními rostlinami, které nebyly vystaveny infekci ani solnému stresu. Z výsledků měření aktivit sledovaných enzymů se zdá, že stresové podmínky v podobě virové infekce způsobují nárůst aktivit NADPH poskytujících NADP-dependentních enzymů.

NADP-ME je enzymem, který se společně s PEPC podílí na regulaci buněčného pH. Také se pravděpodobně účastní regulace otevírání a zavírání průduchů v období nedostatku vody. V naší laboratoři je souvislost NADP-ME s obrannými reakcemi rostlin vůči virové infekci studována dlouhodobě [45,47,54,55]. V rostlinách tabáku vystavených viru PVY<sup>NTN</sup> byl zaznamenán nárůst exprese tohoto enzymu společně s nárůstem množství mRNA cytosolové isoformy NADP-ME a se zvýšením enzymové aktivity NADP-ME [92]. Nárůst aktivity NADP-ME byl zaznamenán i u rostlin tabáku vystavených *A viru bramboru* [54]. Zvýšení aktivity NADP-ME v infikovaných rostlinách oproti zdravým rostlinám byl zaznamenán i v této práci (obr. 23 str. 49). Nejvyšší nárůst aktivity ve stresovaných rostlinách byl nalezen v maximu infekce stanoveném imunochemickou metodou ELISA (obr. 24 str. 50). Zvýšení aktivity NADP-ME bylo také potvrzeno detekcí v gelu po rozdělení proteinů nativní elektroforézou (obr. 16 str. 43). Nárůst aktivity tohoto enzymů oproti kontrolním zdravým rostlinám i oproti infikovaným vzorkům nevystaveným teplotnímu šoku byl zjištěn i v rostlinách tabáku, které byly před infikováním vystaveny teplotě 40 °C (rostliny HSY) (obr. 25 str. 51). Nejvýraznější rozdíly byly opět zaznamenány v maximu infekce. V rostlinách, které byly nejprve infikovány a poté vystaveny teplotnímu šoku (YHS) však byl nárůst v aktivitě NADP-ME mírnější oproti rostlinám infikovaným až po teplotním šoku. Také virová infekce měla v rostlinách YHS celkově slabší průběh, než ve druhé variantě pokusu (HSY). Srovnání obsahu obalového proteinu viru PVY<sup>NTN</sup> metodou ELISA v různých infikovaných rostlinách (Y, HSY a YHS) bylo umožněno provedením všech stanovení na jedné mikrotitrační destičce, neboť se jedná o semikvantitativní metodu (obr. 26 str. 52). Aktivita NADP-ME vzrostla oproti kontrolním rostlinám i při působení stresu zasolením. Významný nárůst v aktivitě nastal v poslední den pokusu (obr. 29 str. 56). Rozdíl v aktivitě NADP-ME ve stresovaných a kontrolních rostlinách byl potvrzen i detekcí v gelu po nativní elektroforetické separaci proteinů (obr. 30 str. 57) Nárůst aktivity NADP-ME byl také zjištěn v rostlinách *Eucalyptus citriodora*, *Aloe vera* L., *Oryza sativa* L. a olivovníku

vystavených solnému stresu a v rostlinách *Secale cereale* po působení kadmia [12,22,26,49,52,92].

Dalším z enzymů, kterým se tato práce zabývala byl NADP-ICDH. Tento enzym v rostlinách produkuje 2-oxoglutarát, který je poskytovatelem uhlíkové kostry pro asimilaci anorganického dusíku a syntézu aminokyselin. Zvýšená aktivita NADP-ICDH byla zjištěna v nodulech hrachu vystavených zatopení [3], také v kořenech rýže a rostlinách žita [26] vystavených nízkým teplotám [36]. Ke zvýšené expresi tohoto enzymu došlo také v kořenech cizrny beraní vystavené vysoké koncentraci soli [35]. Výsledky této diplomové práce ukazují, že jak v rostlinách vystavených biotickému stresu ve formě virové infekce (obr. 20 str. 46), tak v rostlinách stresovaných zvýšenou koncentrací NaCl (obr. 29 str. 56) aktivita NADP-ICDH vzrostla oproti kontrolním rostlinám. V infikovaných rostlinách dosáhla aktivita NADP-ICDH největších rozdílů oproti kontrolním rostlinám v maximu infekce. V rostlinách vystavených působení soli byl rozdíl v aktivitě nejvýraznější v závěrečných dnech pokusu (7. a 8. den). Rozdíly v aktivitách stresovaných a kontrolních rostlin byly také potvrzeny detekcí v gelu po nativní elektroforetické separaci, a to jak pro biotický stres (obr. 16 str. 43), tak pro abiotický stres (obr. 30 str. 57). Zvýšení aktivity NADP-ICDH bylo zjištěno i v listech hrachu v podmínkách solného stresu [94]. Význam zvýšení aktivity NADP-ICDH při působení solného stresu může spočívat ve zvýšené potřebě syntézy aminokyselin. Ty mohou sloužit jako osmoticky aktivní látky především ve stresu ovlivňujícího vodní rovnováhu v rostlině (sucho, chlad, působení vysoké koncentrace soli). Zvýšený obsah aminokyselin a dalších osmoticky aktivních látek (inositolu, galaktinolu a rafinosy) v rostlinách vystavených solnému stresu byl zaznamenán u rýže, kde byl naopak zjištěn pokles v obsahu meziproductů citrátového cyklu [95]. V této práci byl zjištěn nárůst aktivity NADP-ICDH v rostlinách vystavených teplotnímu stresu a poté infikovaných (rostliny HSY), i když oproti infikovaným rostlinám nevystaveným zvýšené teplotě se jednalo pouze o malý nárůst (obr. 25 str. 51). V rostlinách infikovaných a poté vystavených zvýšené teplotě (HSY) byla zaznamenána jen nízká aktivita NADP-ICDH odpovídající slabšímu průběhu infekce.

Dalším sledovaným enzymem v souvislosti se stresem byla G6PDH. Tento enzym je součástí oxidačního pentosafosfátového cyklu. Je významným poskytovatelem NADPH, ribulosa-5-fosfátu a erytrosa-4-fosfátu, které jsou využity v mnohých metabolických

drahách. To je důvod, proč byl tento enzym již v souvislosti ze stresem studován. Je známo, že se G6PDH podílí na odpovědi vůči stresu chladem, těžkými kovy i zasolením [12,14,22,23]. V této práci bylo zjištěno, že virová infekce způsobená PVY<sup>NTN</sup> v rostlinách tabáku také aktivitu G6PDH ovlivňuje. V maximu infekce potvrzeném imunochemicky (obr. 21 str. 47) byl zaznamenán velký nárůst aktivity G6PDH oproti neinfikovaným rostlinám (obr. 20 str. 46). Rozdíl v aktivitě G6PDH ve stresovaných a kontrolních rostlinách byl také potvrzen specifickou detekcí v gelu po nativní elektroforetické separaci (obr. 16 str. 43). Při sledování aktivity G6PDH v rostlinách vystavených virové infekci v kombinaci s teplotním šokem byl podobně jako u NADP-ME a NADP-ICDH zjištěn nárůst aktivity v rostlinách vystavených zvýšené teplotě a teprve poté infikovaných (rostliny HSY), který nastal v maximu infekce. Od rostlin infikovaných avšak nevystavených vyšší teplotě (rostliny Y) se podobně jako u NADP-ICDH nejednalo o velký rozdíl ve zvýšení aktivity G6PDH. V rostlinách infikovaných a poté vystavených teplotnímu šoku (rostliny YHS) nebyl zaznamenán nárůst aktivity sledovaného enzym, podobně jak tomu bylo u předchozích dvou enzymů (obr. 25 str. 51). Při sledování vlivu zasolení na aktivitu G6PDH byl zaznamenán značný nárůst aktivity ve stresovaných rostlinách oproti rostlinám kontrolním (obr. 29 str. 56). Tento rozdíl v aktivitě byl také ověřen detekcí v gelu po nativní elektroforetické separaci (obr. 30 str. 57).

NP-GPD je součástí člunkového systému, jehož úlohou je nepřímý transport NADPH vzniklého při fotosyntéze z chloroplastů do cytosolu. Také se účastní odpovědi na různé typy stresu, jako je oxidativní stres [56], nedostatek fosfátu [60], či stres zatopením a suchem [63]. V této práci byl studován vliv solného stresu na aktivitu NP-GPD v rostlinách tabáku.

V rostlinách vystavených vyšší koncentraci soli byl zaznamenán vysoký nárůst aktivity NP-GPD (10-násobný). K nejvýraznějším rozdílům v aktivitě oproti kontrolním rostlinám došlo 7. a 8. den působení stresu (obr. 29 str. 56). V opakování tohoto pokusu s rostlinami z nového výsevu nárůst aktivit NADP-ME, NADP-ICDH, G6PDH, NP-GPD a SDH zaznamenán nebyl, což bylo pravděpodobně způsobeno podstatně větším vzrůstem těchto rostlin. Je možné, že použita koncentrace soli nebyla dostačující pro vyvolání srovnatelné metabolické odpovědi jako s rostlinami menšího vzrůstu předešlého pokusu.

SDH je součástí šikimátové dráhy, biosyntetické dráhy spotřebovávající NADPH. Funkcí této dráhy, vyskytujícího se pouze u rostlin a mikroorganismů, je syntetizovat

aromatické aminokyseliny. Tato dráha je však nejen poskytovatelem aromatických aminokyselin potřebných pro syntézu bílkovin, ale také poskytuje prekurzory pro syntézu celé řady sekundárních metabolitů produkovaných rostlinou, mezi které patří i obranné látky. SDH byla také studována v souvislosti s různými typy stresu, jako je působení těžkých kovů [70,71], vystavení oxidativnímu stresu ve formě kyseliny salicylové [74], či stres nízkou teplotou [14]. V této práci byla pozorována změna aktivity SDH v rostlinách tabáku vystavených virové infekci (obr. 15 str. 42) a vysoké koncentraci soli (viz následující souhrnná tabulka č. 4 str. 67). Také byl sledován vliv teplotního šoku v kombinaci s virovou infekcí na aktivitu SDH. V infikovaných rostlinách byl zaznamenán spíše pokles aktivity tohoto enzymu. Zvýšená aktivita oproti kontrole byla zaznamenána jen u jednoho opakování pokusu. V rostlinách vystavených infekci a zároveň zvýšené teplotě došlo k výraznějšímu zvýšení aktivity jen v rostlinách infikovaných a poté vystavených vyšší teplotě (YHS), a to v 6. den po inokulaci, kdy virová infekce ještě nebyla plně rozvinutá (obr. 25 str. 51). V maximu infekce došlo k celkovému poklesu aktivity SDH, a to jak u stresovaných tak u kontrolních vzorků. Pro potvrzení tohoto výsledku by bylo potřeba ještě dalšího opakování tohoto pokusu. Aktivita SDH v rostlinách vystavených soli vzrostla oproti rostlinám kontrolním. Ke zvýšení došlo 7. a 8. den působení stresu (obr. 29 str. 56). Zvýšení aktivity SDH byl zaznamenán např. i v rostlinách *Matricaria chamomilla* vystavených vyšší koncentraci soli [96].

Původní předpoklad, že v rostlinách vystavených stresu, ve kterých je negativně ovlivněna fotosyntéza, což má za následek nedostatek NADPH bude zvýšená aktivita NADP-dependentních enzymů se potvrdil, jak dokládá souhrnný přehled procentuálního zvýšení aktivit studovaných enzymů v tabulce 4 str. 67. V rostlinách infikovaných virem PVY<sup>NTN</sup> byla zjištěna vyšší koncentrace NADP<sup>+</sup>, než v rostlinách kontrolních (tab. 1 str. 45 a tab. 2 str. 48). To by mohlo naznačovat snížení množství NADPH, neboť poměr NADP<sup>+</sup>/NADPH bývá udržován konstantní. V budoucí práci by bylo zajímavé sledovat i množství NADPH, buď enzymovou metodou využívající NADPH-dependentní enzym, nebo např. metodou kapilární elektroforézy s následnou MS detekcí. Optimalizace metod je však náročná vzhledem k nízkým koncentracím koenzymu jak redukovaného, tak oxidovaného.

Jak bylo v naší laboratoři zjištěno již dříve, PVY<sup>NTN</sup> způsobuje v rostlinách *Nicotiana tabacum* L, cv Petit Havana, SR1 významné snížení rychlosti fotosyntézy ( $P_N$ ),

vodivosti průduchů (g) a fluorescence chlorofylu [54]. Metodou stanovení aktivity Rubisco využívající radioaktivně značený CO<sub>2</sub> byl v těchto rostlinách rovněž zjištěn významný pokles aktivity prvního enzymu Calvinova cyklu, Rubisco [97]. Tento cyklus spotřebovávající NADPH je důležitý v asimilaci CO<sub>2</sub> a poskytování sacharidových prekurzorů. Množství proteinu Rubisco bylo v této práci sledováno v gelu po SDS elektroforetické separaci (obr. 22 str. 48 a obr. 31 str. 57) Z výsledků se zdá, že přítomnost virové infekce množství proteinu Rubisco v listech tabáku příliš neovlivnila, zatímco v pokusu se solným stresem je patrný značný pokles množství proteinu Rubisco, zejména 8. den působení stresu. Tomu odpovídají také významně zvýšené aktivity NADP-dependetních enzymů 2. pokusu s menšími rostlinami.

**Tab. č. 4:** Přehled nejvyšších nárůstů aktivit studovaných enzymů v jednotlivých pokusech vyjádřený v procentech. ↓-pokles aktivity. **PVY 1** až **3**- stres virovou infekcí; **SŮL 1** a **2**- stres zasolením.

Enzym	PVY 1 (%)	PVY 2 (%)	PVY 3 (%)	SŮL 1 (%)	SŮL 2 (%)
<b>NADP-ME</b>	190	150	240	200	210
<b>NADP-ICDH</b>	170	300	215	350	600
<b>G6PDH</b>	180	220	170	300	870
<b>SDH</b>	↓	160	↓	350	550
<b>NP-GPD</b>				1000	

Abiotický stres byl v rostlinách vystavených působení soli kvantifikován stanovením koncentrace sodných iontů metodou AES (tab. 3 str. 58). Koncentrace sodných iontů ve stresovaných rostlinách byla oproti kontrolním rostlinám vyšší ve všech dnech působení stresu. K nejvyššímu nárůstu došlo 3. den působení soli. V sedmý den stresu byla koncentrace sodných iontů nižší oproti koncentraci 3. den, což může znamenat, že rostliny začaly sodné ionty eliminovat. Účinné vyloučení iontů z rostliny je jednou ze dvou základních strategií, kterými se rostliny přizpůsobují stresu zasolením [79]. Stejně jako v rostlinách *Carex moocroftii* může být poskytování NADPH pro NADPH-oxidasu (nejen G6PDH, ale jak vyplývá z této práce i dalšími NADP-dependetními enzymy) důležité pro vznik peroxidu vodíku jako signální molekuly. Ta poté zvyšuje rychlost H<sup>+</sup>-

ATPasy a antiporteru  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  plazmatické membrány, čímž dochází k vylučování  $\text{Na}^+$  iontů. Dalším způsobem, jak se vyrovnat se zvýšenou přítomností  $\text{Na}^+$  iontů, je jejich uskladnění ve vakuole, čímž se sníží jejich obsah v cytoplasmě [91].

V rámci pokusu s infekcí kombinovanou s teplotním šokem byla ve vzorcích imunochemicky detekována přítomnost HSP 70 (obr. 27 str. 53). Nevyšší obsah byl zaznamenán v rostlinách vystavených vyšší teplotě a poté infikovaných (HSY), zatímco nejméně se tento protein vyskytoval v kontrolních rostlinách (K). HSP slouží jako konstitutivně přítomné chaperony účastníci se sbalování, transportu a prevence agregaci proteinů, ale také patří mezi stresem indukované proteiny, podílející se na signalizaci při odpovědi na stres [82]. Zvýšená exprese HSP 70 v rostlinách pozitivně koreluje se získáváním tolerance vůči vyšší teplotě, ale také souvisí se zvýšením tolerance vůči dalším typům abiotického stresu [83]. V souvislosti s biotickým stresem se však podle některých studií zdá, že HSP jsou využívány viry při šíření rostlinou, např. studie provedena na rostlinách tabáku poukazuje na nutnou přítomnost HSP 70 a HSP 40 pro zdárný průběh virové infekce [98]. Také rostliny *Arabidopsis* s umlčenými geny pro HSP 70 vykazovaly vyšší toleranci pro virovou infekci, než měly rostliny kontrolní [82]. V jiných pracích naopak teplotní šok indukoval obranné odpovědi, které průběh virové infekce zmírnily [99]. V této práci bylo zjištěno úspěšné rozvinutí virové infekce v rostlin tabáku vystavených teplotnímu šoku před inokulací (HSY rostliny). Tyto rostliny také vykazovaly zvýšenou aktivitu sledovaných enzymů a 3. den po působení stresu zvýšené množství proteinu HSP 70. Avšak množství obalového proteinu viru přítomného v těchto rostlinách bylo o polovinu nižší než u rostlin infikovaných bez teplotního šoku, což naznačuje, že teplotní šok mohl indukovat obranné mechanismy působící i proti virové infekci. V rostlinách nejprve infikovaných a poté vystavených teplotnímu šoku (YHS) byla infekce rozvinuta jen málo, i změny aktivit sledovaných enzymů byly malé. To mohlo být způsobeno tzv. thermoterapií, avšak i slabou inokulací. Pro ověření výsledků je nutné pokus zopakovat.

Všechny studované typy stresu (virová infekce, teplotní šok i solný stres) indukovaly v rostlinách tabáku zvýšení aktivit NADP-dependentních enzymů. Zdá se, že čím je míra stresu větší (kvantifikovaná množstvím obalového proteinu viru, HSP 70, nebo stanovením obsahu  $\text{Na}^+$  iontů), tím větší je odpověď v podobě aktivace těchto enzymů.



## 6 Závěr

1. V listech rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) vystavených působení virové infekci PVY<sup>NTN</sup> došlo ke zvýšení aktivity NADP-ICDH (o 200 %), G6PDH (o 120 %) a NADP-ME (o 140 %). Zatímco v případě SDH byl zaznamenán spíše pokles aktivity.

2. Studium vlivu teplotního šoku v kombinaci s infekcí PVY<sup>NTN</sup> na NADP-dependentní enzymy bylo zjištěno, že k největšímu nárůstu aktivit studovaných enzymů došlo v rostlinách nejprve vystavených teplotnímu šoku (40 °C 2 hodiny) a poté infikovaných. Zvýšení již bylo pouze mírné oproti rostlinám pouze infikovaným.

3. Solný stres způsobil podstatný nárůst aktivit všech sledovaných enzymů: NADP-ME (o 110 %), NADP-ICDH (o 500 %), G6PDH (o 770 %) a SDH (o 450%) a NP-GPD (o 900 %).

## 7 Seznam použité literatury

---

- [1] Mateos, R.M., Bonilla-Valverde, D., del Río, L.A., Palma, J.M., Corpas, F.J.: *Physiol. Plant.* 135, 130-139 (2009)
- [2] Pollak, N., Dölle, Ch., Ziegler, M.: *Biochem. J.* 403, 205-218 (2007)
- [3] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: *NADP-dependant enzymes and abiotic stress v knize Abiotic Stress New Resarch* (Haryana, N., Punj, S.) Novascience Publishers, New York, str. 57-98 (2012)
- [4] Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [5] Kirkensgaard, K. G., Hagglund, P., Finnie, C., Svensson, B., Henriksen, A.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65, 932-941 (2009)
- [6] Noctor, G.: *Plant Cell Environ.* 29, 409-425 (2006)
- [7] Hauschild, R., von Schaewen, A.: *Plant Physiol.* 133, 47-62 (2003)
- [8] Herrmann, K.M.: *Plant Cell* 7, 907-919 (1995)
- [9] Huang, J., Zhang, H., Wang, J., Yang, J.: *Mol. Biol. Rep.* 30, 223-227 (2003)
- [10] <[www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)>, staženo dne 14.3.2012
- [11] Singh. S., Anand, A., Srivastava, P. K.: *Int. J. Plan Physiol. Biochem.* 4, 1-19 (2012)
- [12] Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y.: *Plant Cell Physiol.* 48, 511-522 (2007)
- [13] Pandolfi, P.P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., Luzzatto, L.: *EMBO Journal* 14, 5209-5215 (1995)
- [14] Li, J., Chen, G., Wang, X., Zhang, Y., Jia, H., Bi, Y.: *Physiol. Plant.* 141, 239-250 (2011)
- [15] Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Distefano, S., Palma, J.M., Lupianez, J.A., del Río, L.A.: *Biochem. J.* 330, 777-784 (1998)
- [16] Huang, J., Zhang, H., Wang, J., Yang, J.: *Mol. Biol. Rep.* 30, 223-227 (2003)
- [17] Demir, H., Beydemir, S., Cifci, M., Küfrevioğlu, Ö.: *J. Food Biochem.* 28, 155-168 (2004)
- [18] Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemie*, 1. české vydání, Victoria Publishing, Praha (1995)
- [19] Cosgrove, M. S., Naylor, C., Paludan, S., Adams, M.J., Levy, H.R.: *Biochemistry* 37(9), 2759-67 (1998)

- 
- [20] Heldt, H.-W., Piechulla, B., Heldt, F.: Plant Biochemistry. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo (2011)
- [21] Hermes, J. D., Cleland, W.W.: J. Am. Chem. Soc. 106, 7263-7264 (1984)
- [22] Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gómez.Rodríguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R., Fernandez-Ocaña, Del Río, L.A., Barroso, J.B.: Plant Cell Environ. 29, 1449-1459 (2006)
- [23] Nemoto, Y., Sasakuma, T.: Plant Sci., 158, 53-60 (2000)
- [24] Wang, X., Ma, Y., Huang, Ch., Li, J., Wan, Q., Bi, Y.: Plant Signal. Behav. 3, 394-395 (2008)
- [25] Smiri, M., Chaoui, A., Ferjani, E.: J. Plant Physiol. 166, 259-269 (2009)
- [26] Crecelius, F., Streb, P., Feierabend, J.: J. Exp. Bot. 54, 1075-1083 (2003)
- [27] Alvarado, A., Flores, M.E.: Biotechnol. Lett. 25, 1175-1178 (2003)
- [28] Palomo, J., Gallardo, F., Suárez, M.F., Cánovas, F.M.: Plant Physiol. 118, 617-626 (1998)
- [29] Moller, I. M., Rasmusson, A. G.: Trends Plant Sci., 3, 21-27 (1998)
- [30] Gálvez, L., González, E.M., Arrese-Igor, C.: J. Exp. Bot. 56, 2551-2561 (2005)
- [31] Fedøy, A., Yang, N., Martinez, A., Leiros, H.S., Steen, I.H.: J. Mol. Biol. 372, 130-149 (2007)
- [32] Meixner-Monori, B., Kubicek, Ch.P., Harrer, W., Schreferl, G., Rohr, M.: Biochem. J. 236, 549-557 (1986)
- [33] Marino, D., González, E.M., Fernando, P., Puppo, A., Arrese-Igor, C.: Planta 225, 413-421 (2007)
- [34] Mhamdi, A., Mauve, C., Houda, G., Saindrenan, P., Hodges, M., Noctor, G.: Plant Cell Environ. 33, 1112-1123 (2010)
- [35] Molina, C., Zaman-Allah, M., Khan, F., Fatnassi, N., Horres, R., Rotter, B., Steinhauer, D., Amenc, L., Drevon, J. J., Winter, P., Kahl, G.: BMC Plant Biol. 11, 1-26 (2011)
- [36] Lu, B.B., Yuan, Y.Z., Zhang, C.F., Ou, J.Q., Zhou, W., Lin, Q.H.: Plant Sci., 169, 295-302 (2005)
- [37] Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H.: J. Plant Physiol. 160, 367-376 (2002)

- 
- [38] Chen, L., Tang, N., Jiang, H., Yang, L., Li, Q., Smith, B.R.: J. Plant Physiol. 166, 2023-2034 (2009)
- [39] Gregory, A.L., Hurley, B.A., Tran, H.T., Valentine A.J., She, Y.M., Knowles, V.L., Plaxton, W.C.: Biochem. J. 420, 57-65 (2009)
- [40] Toyota, K., Koizumi, N., Sato, F.: J.Exp. Bot. 54, 961-969 (2003)
- [41] Ma, J.F., Furukawa, J.: J. Inorg. Biochem. 97, 46-51 (2003)
- [42] Edwards, G., Andreo, C.S.: Phytochemistry 31, 1845-1857 (1992)
- [43] Wedding, R.T.: Plant Physiol. 90, 367-371 (1989)
- [44] Casati, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E., Andreo, C.S.: Photosynth. Res. 61, 99-105 (1999)
- [45] Doubnerová, V., Ryšlavá, H.: Plant Sci. 180, 575-583 (2011)
- [46] Ferreyra, M.L.F., Andreo, C.S., Podestá, F.E.: Plant Sci. 164, 95-102 (2003)
- [47] Doubnerova, V., Potuckova, L., Muller, K., Ryslava, H.: J. Serb. Chem. Soc., 74, 893-906 (2009)
- [48] Muller, G.L., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Lara, M.V.: Plant Cell Physiol. 49, 469-480 (2008)
- [49] Chi, W., Yang, J., Wu, N., Zhang, F.: Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 1865-1874 (2004)
- [50] Laporte, M. M., Shen, B., Tarczynski, M.C.: J. Exp. Bot. 53, 699-705 (2002)
- [51] Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J.: Plant Physiol. Bioch. 43, 437-444 (2005)
- [52] Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E.: Plant Physiol. Bioch 43, 573-582 (2005)
- [53] Dizengremel, P., Le Thiec, D., Hasenfratz-Sauder, M.P., Vaultier, M. N., Bagard, M., Jolivet, Y.: Plant Biol. (Stuttg), 11, 35-42 (2009)
- [54] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H., Čeřovská, N.: Photosynthetica 41, 357-363 (2003)
- [55] Doubnerová, V., Müller, K., Čeřovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H.: Int. J. Mol. Sci. 10, 3583-3598 (2009)
- [56] Bustos, D. M., Bustamante, C.A., Iglesias, A.A.: J. Plant Physiol., 165, 456-461 (2008)
- [57] Gao, Z., Loescher, W.H.: Plant Physiol., 124, 321-330 (2000)

- 
- [58] Bustos, D. M., Iglesias, A.A.: FEBS Lett., 530, 169-173 (2002)
- [59] Casati, D.F.G., Sesma, J.I., Iglesias, A.A.: Plant Sci. 154, 107-115 (2000)
- [60] Shenoy, V.V., Kalagudi, G. M.: Biotechnol. Adv. 23, 501-513 (2005)
- [61] Duff, S. M., Moorhead, G. B., Lefebvre, D. D., Plaxton, W. C.: Plant Physiol., 90, 1275-1278 (1989)
- [62] Shinano, T., Nanamori, M., Dohi, M., Wasaki, J., Osaki, M.: Plant Soil, 269, 81-87 (2005)
- [63] Pillai, M. A., Lihuang, Z., Akiyama, T.: Theor. App. Genet. 105, 34-42 (2002)
- [64] Herrmann, K.M.: Plant Cell 7, 907-919 (1995)
- [65] Tzin, V., Galili, G.: Mol Plant, 3, 956-972 (2010)
- [66] Betz, G.A., Knappe, C., Lapierre, C., Olbrich, M., Welzl, G., Langebartels, C., Heller, W., Sandermann, H., Ernst, D.: European J. Forest Res. 128, 109-116 (2009)
- [67] Ding, L., Hofius, D., Hajirezaei, M.R., Fernie, A.R, Börnke, F., Sonnewald, U.: J. Exp. Bot. 58, 2053-2067 (2007)
- [68] Sanderson, G.W.: Biochem. J. 98, 248-252 (1966)
- [69] Singh, S.A., Christendat, D.: Crystal Growth Des. 7, 2153-2160 (2007)
- [70] Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F., Bačkor, M.: Plant Soil 320, 231-242 (2009)
- [71] Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M.: J. Plant Physiol. 166, 1460-1464 (2009)
- [72] Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P., Hou, J., Qian, J.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1297-1303 (2011)
- [73] Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F., Merino, F.: Plant Sci. 161, 179-188 (2001)
- [74] Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y.: Molecules 23, 607-621 (2007)
- [75] Cao, X., Zong, Z., Ju, X., Sun, Y., Dai, C., Liu, Q., Jiang, J.: Mol. Biol. Rep., 37, 1559-1567 (2010)
- [76] Lourenco, E.J., Lemos Silva, G.M., Neves, V.A.: J. Agric. Food Chem. 39, 458-462 (1991)
- [77] Taiz, L., Zieger, E.: Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (2006)
- [78] Becker, F., Buschfeld, E., Schell, J., Buchmair, A.: Plant J. 3, 875-881 (1993)
- [79] Sanchez, D.H., Pieckenstain, F.L., Escaray, F., Erban, A., Kraemer, U., Udvardi, M.K., Kopka, J.: Plant Cell Environ. 34, 605-617 (2011)

- 
- [80] Jacobs, A., Ford, K., Kretschmer, J., Tester, M.: *Plant Biotechnol. J.* 9, 838-847 (2011)
- [81] Demichik, V., Maathuis, F.J.M.: *New Phytologist* 175, 387-404 (2007)
- [82] Jungkuntz, I., Link, K., Vogel, F., Voll, L.M., Sonnewald, S., Sonnewald, U.: *The Plant J.* 66, 983-995 (2011)
- [83] Chen, Z., Zhou, T., Wu, X., Hong, Y., Fan, Z., Li, H.: *Mol. Plant. Pathol.* 9, 809-817 (2008)
- [84] Kolektiv: *Biochemie skriptum PřF UK Praha*, str. 44 (2009)
- [85] Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [86] Lee, D.H., Lee, C.B.: *Plant Sci.* 159, 75-85 (2000)
- [87] Maurino, V.G., Saigo, M., Andreo, C.S., Drincovich M.F.: *Plant Mol. Biol.* 45, 409-420 (2001)
- [88] Čerovská, N.: *Plant Pathol.* 47, 505-509 (1998)
- [89] Berka, A., Bílý, J.: *Analytická chemie pro posluchače učitelských kombinací s chemií skriptum PřF UK Praha*, str. 169 (1993)
- [90] Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- [91] Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C.: *Ann. Bot.* 103, 551-560 (2009)
- [92] Doubnerová, V., Muller, K., Čerovská, N., Synková, H., Spoustová, P., Ryšlavá, H. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3583-3598 (2009)
- [93] Aragao, M.E.F., Jolivet, Y., Lima, M.G.S., Melo, D.F., Dizengremel, P.: *Trees* 12, 66-72 (1997)
- [94] Popova, O.V., Popova, T.N., Izmailov, S.F.: *Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2, 174-179 (2001)
- [95] Widodo, Patterson, J.H., Newbiggin, E., Tester, M., Bacic, A., Roessner, U.: *J. Exp. Bot.* 60, 4089-4103 (2009)
- [96] Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Bačkor, M.: *Ecotoxicology* 18, 544-554 (2009)
- [97] Synková, H., Semoradová, S., Schnablová, R., Muller, K., Pospíšilová, J., Ryšlavá, H., Malbeck, J., Čerovská, N.: *Plant Sci.* 171, 607-616 (2006)
- [98] Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, Ch., Jungkuntz, I., Bornke, F., Maiss, E., Sonnewald, U.: *J. Virol.* 81, 11870-11880 (2007)
- [99] Gorovits, R., Akad, F., Beery, H., Vidavsky, F., Mahadav, A., Czosnek, H.: *Mol. Plant Microbe In.* 20, 1376-1383 (2007)